

Charakterisierung einer neuen Aspartylglukosaminurie-Mutation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von Gülec, Christina
aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der
Justus- Liebig- Universität Gießen,
Gf. Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: Prof. Dr. Niepmann

Tag der Disputation: 19.01.2017

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1. Lysosomen.....	1
1.1.1.Funktion der Lysosomen und Hydrolasen.....	1
1.1.2. Biosynthese und Transport lysosomaler Proteine	2
1.2. Proteinfaltung und Modifizierung	4
1.3. Aspartylglukosaminidase (AGA)	5
1.3.1.Struktur von AGA.....	5
1.3.2.AGA- cDNA und – Gen	6
1.3.3.Autokatalytische Aktivierung von AGA	7
1.4. Aspartylglukosaminurie (AGU)	8
1.4.1.Pathogenese und Symptome von AGU	9
1.4.2.AGU <small>Fin-major – und -minor–</small> Mutationen	9
1.4.3.Weitere AGU- Mutationen	10
1.5. Ziele der Arbeit.....	11
2.Material	13
2.1. Materialien und Geräte	13
2.2. Chemikalien und Puffer	15
2.3. Kits und Säulen	18
2.4. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.5.Plasmide	20
2.6. Primer	20
2.7. Humane Zelllinien und Bakterienstämme.....	21
3.Methoden.....	22
3.1.Zellbiologische Standardmethoden	22
3.1.1.Kultivierung von HEK- und HeLa-Zellen.....	22
3.1.2.Passagieren von HEK- und HeLa-Zellen.....	22
3.1.3.Transiente Transfektion von HEK- und HeLa-Zellen mit Plasmid- DNA	22
3.1.4. Stabile Transfektion von HEK- und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA.....	23
3.1.5. Auftauen und Einfrieren der Zellen	24
3.1.6. Immunfluoreszenz.....	24
3.2.Molekularbiologische Standardmethoden.....	25
3.2.1.Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	25
3.2.2.Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte	26

3.2.3. Restriktionsspaltung von Vektor und PCR-Fragment	26
3.2.4. Ligation und Transformation	26
3.2.5. Plasmidpräparation (Mini)	27
3.2.6. Plasmidpräparation (Midi)	28
3.2.7. Zellysatherstellung aus HEK- und HeLa-Zellen	28
3.2.8. Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration	28
3.2.9. SDS-PAGE	29
3.2.10. Western-Blot	29
3.3. Aktivitätsassays	31
3.3.1. Photometrische AGA-Aktivitätsbestimmung (nach Tikkanen et al. 1995)	31
3.3.2. Fluorimetrischer AGA- Aktivitätsassay (Voznyi et al. 1993, Mononen et al. 1993) ...	31
3.4. Statistik	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Klonierung von AGA-T122K und WT-AGA in die Plasmide: pEXPR-IBA-103, pCMV-Tag-5A und pcDNA3	33
4.2. Expression von AGA- T122K in unterschiedlichen Zellen	34
4.2.1. Expression von AGA-T122K-myc in transient transfizierten HEK-Zellen	35
4.2.2. Expression von AGA-T122K-pcMV-tag-5A in Hela-Zellen	36
4.2.3. Expression von AGA-T122K-pcDNA3 in stabil transfizierten Hela-Zellen	36
4.2.4. Expression von AGA-T122K in Hautfibroblasten (Wildtyp und T122K-Mutation)	38
4.3. AGA-Aktivitätsmessungen der Patienten-Fibroblasten	41
4.3.1. Aktivität des Patienten-AGAs im Vergleich zum WT-AGA	43
5. Diskussion	46
5.1. Vergleich von AGA- T122K-Mutation mit einigen bekannten AGA- Mutationen	46
5.2. Expression und lysosomale Lokalisation von AGA- T122K	48
5.3. Mögliche Therapieansätze für Aspartylglukosaminurie	51
5.4. Ausblick	53
6. Abstract	54
7. Zusammenfassung	56
8. Abkürzungsverzeichnis	57
9. Abbildungsverzeichnis	59
10. Tabellenverzeichnis	60
11. Literaturverzeichnis	61
Erklärung zur Dissertation	68

Danksagung	69
Tabellarischer Lebenslauf.....	69

1. Einleitung

1.1. Lysosomen

Lysosomen, welche 1955 entdeckt wurden, sind zytoplasmatische Organellen und spielen eine außerordentlich wichtige Rolle im intrazellulären Verdauungssystem in nahezu allen eukaryotischen Zellen. Diese Organellen sind von einer Membran begrenzt und enthalten verschiedene hydrolysierende Enzyme (meist saure Hydrolasen), die bei saurem pH aktiv sind (Bainton et al. 1981, Hamer et al. 2012).

1.1.1. Funktion der Lysosomen und Hydrolasen

Es liegen mehr als 60 verschiedene saure Hydrolasen vor (Xu H et al. 2015). Die Vielfalt der sauren Hydrolasen ist in Abbildung 1 gezeigt. Deren Charakterisierung erfolgte hauptsächlich aufgrund ihrer Funktionen (de Duve 1963).

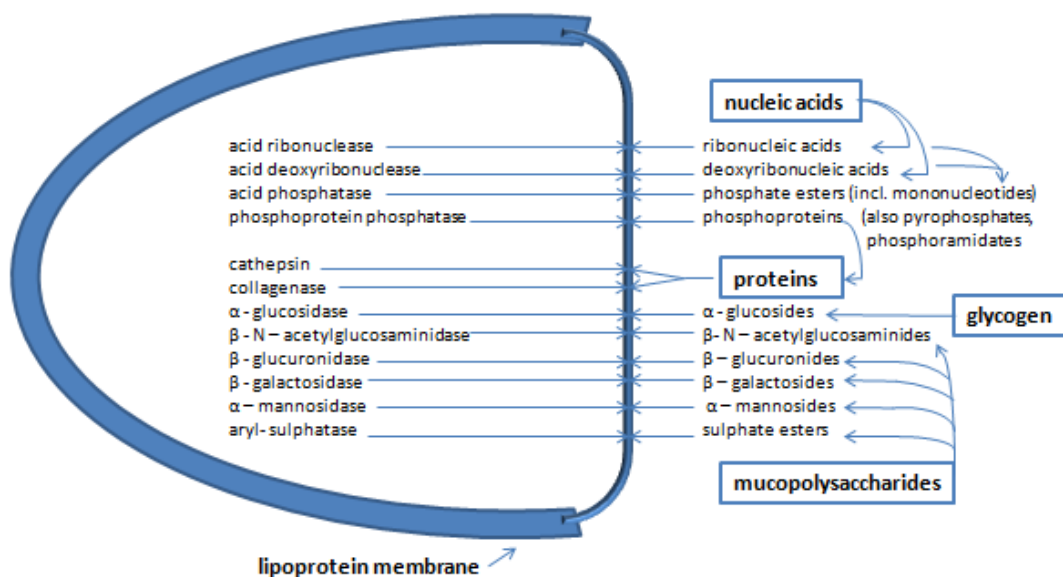
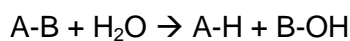


Abbildung 1: „Lysosomen als biochemisches Konzept“ modifiziert nach De Duve 1963: Es sind die wichtigsten lysosomalen Enzyme der Rattenleber zusammengefasst.

Das saure Milieu mit einem pH von 4,6-5,0 wird von der H⁺-ATPase des V-Typs, welche sich in der lysosomalen Membran befindet, aufrechterhalten (Bainton et al. 1981, Kurz et al. 2008, Mindell et al. 2012).

Die Gesamtheit der hydrolytischen lysosomalen Enzyme sind für die Degradierung der meisten Makromoleküle, die in die Lysosomen via Endozytose, Phagozytose oder Autophagozytose gelangen, zuständig (Hamer et al. 2012). Mutierte lysosomale Enzyme sind der Hauptgrund für viele lysosomale Speicherkrankheiten. Diese sind hauptsächlich durch die Akkumulation des Substrates für die korrespondierenden Hydrolasen, die in ihrer ursprünglichen Funktion eingeschränkt sind, gekennzeichnet (Kurz et al. 2008).

Im Gegensatz zu den anderen intrazellulären Organellen, können die Lysosomen nicht anhand der typischen morphologischen Kriterien wie Größe, Form und innere Strukturen charakterisiert werden. Grund für diese große Vielfalt der Lysosomen sind die unterschiedlichen sauren Hydrolasen (De Duve 1963). Gemeinsam sind sie dafür zuständig, alle Klassen von Makromolekülen nach dem folgenden Schema zu hydrolysieren (Bainton 1981):



Die durch die Hydrolasen entstandenen monomeren Reste werden mit spezifischen Transportern, die sich innerhalb der lysosomalen Membran befinden, aus den Lysosomen geschleust und recycelt (Saier et al. 1999). Die Fusion zwischen Endosomen, Phagosomen, und Autophagosomen mit den Lysosomen führt zur Degradierung der Makromoleküle mit Hilfe der hydrolytischen lysosomalen Enzyme (Luzio et al. 2000, Saftig et al. 2009).

1.1.2. Biosynthese und Transport lysosomaler Proteine

Lysosomale Membranproteine werden am rauen endoplasmatischen Retikulum, wo die N-Glykosylierung stattfindet, synthetisiert (Peters et al. 1994). Im Anschluss werden sie in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Es werden aktuell drei unterschiedliche Transportwege der lysosomalen Proteine vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Lysosomen diskutiert. Die erste Möglichkeit besteht darin, dass die Proteine zur Zelloberfläche transportiert werden. Anschließend gelangen sie über Endozytose zu den Endosomen und schließlich zu den Lysosomen (Braun et al. 1989). Die zweite Möglichkeit des lysosomalen Transportweges ist der direkte Transport vom TGN zu den Lysosomen (Höning et al. 1996, siehe Abbildung 2). Der dritte Transportweg erfolgt über sekretorische Vesikel. Mit Hilfe von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren erfolgt der Transport lysosomaler Hydrolasen AP-1 (Adapter-Protein-Komplex) und

Clathrin-vermittelt vom TGN zu den frühen Endosomen. Nach Entmantelung der Vesikel erfolgt die Fusion dieser Zwischenprodukte mit den frühen bzw. späten Endosomen. Die Endosomen stellen die letzte Station des intrazellulären Transportweges, bei dem die MPRs recyclet und zurück zum TGN transportiert werden, dar. MPRs befinden sich auch in der Plasmamembran. Dort können sie AP-2- und Clathrin-vermittelt in Vesikeln (4) internalisiert werden und über das späte Endosom wieder zum TGN gelangen.

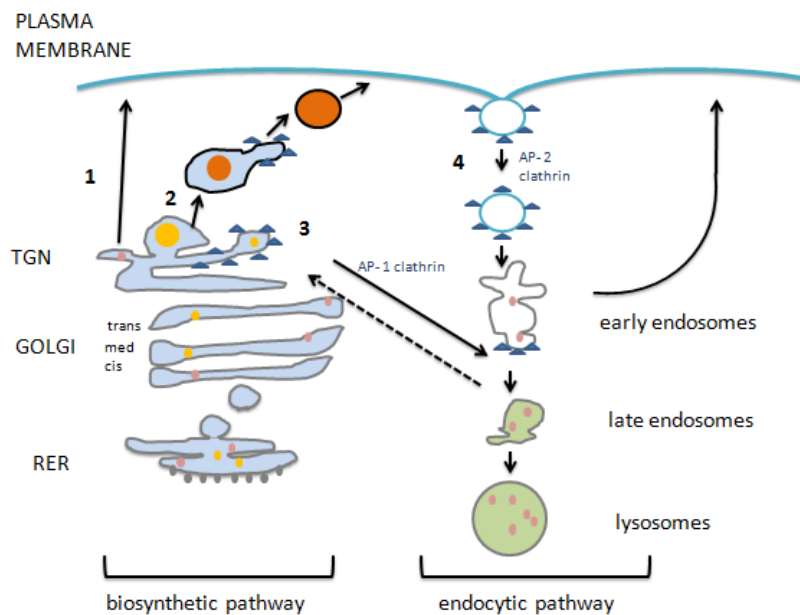


Abbildung 2: „Biosynthetischer und endozytotischer Signalweg“ modifiziert nach Le Borgne *et al.* 1998: Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), welcher die letzte Station des sekretorischen Transportwegs darstellt, werden die Membran- und löslichen Proteine verpackt und in drei Transportwege einsortiert : Zur Plasmamembran (1), in sekretorische Vesikel (2) und zu den Endosomen (3). Der Transport lysosomaler Hydrolasen findet AP-1 (Adapter-Protein-Komplex) und Clathrin-vermittelt vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den späten Endosomen durch Mannose-6-Phosphat-Rezeptor statt. Nachdem die Vesikel entmantelt werden, fusionieren diese Zwischenprodukte mit den frühen bzw. späten Endosomen. Aktuell ist bewiesen worden, dass die Endosomen die letzte Station des intrazellulären Transportweges, bei dem die MPRs recyclet und zurück zum TGN transportiert werden, darstellen. Auch in der Plasmamembran befinden sich MPRs, welche über AP-2- und Clathrin-umhüllte Vesikel (4) internalisiert werden können oder über das späte Endosom zum TGN gelangen.

1.2. Proteinfaltung und Modifizierung

Die Fähigkeit der Proteinmoleküle, sich in ihre hochstrukturierten Zustände zu falten, ist eine der bedeutendsten evolutionären Leistungen der Biologie (Dinner et al. 2000).

Sie werden in einzigartige, drei-dimensionale Strukturen gefaltet, aber wie der Wechsel zu diesen Unikaten erfolgt und wie sie hierbei ihre ursprüngliche Faltung aufrechterhalten, wird kontrovers diskutiert (Sippl et al. 1996).

Die dreidimensionale Struktur des nativen Proteins ist von der Aminosäuresequenz vorgegeben und weist die niedrigste freie Gibbs-Energie auf (Epstein et al. 1963, Huang et al. 2012). Der hydrophobe Charakter der Aminosäuren spielt eine determinierende Rolle bezüglich der Faltungskinetik, wohingegen andere Faktoren wie Größe, Polarität und isoelektrischer Punkt weniger Einfluss auf die Faltungsrate haben (Huang et al. 2012). Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist verantwortlich für die ordnungsgemäße Faltung und Prozessierung von sezernierten und Transmembran-Proteinen (Gupta et al. 2015).

Die Faltung und der Aufbau der naszierenden Proteine benötigt eine feine Balance zwischen korrekter Faltung und Vermeidung unerwünschter Interaktionen, die zu Fehlfaltungen und/ oder Aggregationen führen können.

Es wurden zwei Gruppen von Proteinen, die transient mit unvollständig gefalteten und angesammelten Proteinen im ER interagieren, charakterisiert. Die erste Gruppe besteht aus Enzymen, die die Proteinfaltung begünstigen und stabilisieren. Die zweite Gruppe sind die sogenannten „molekularen Chaperone“, die transient an die naszierende Polypeptidkette binden und Fehlfaltungen verhindern, indem sie die sonst zu unkorrekter Faltung führenden Regionen verdecken (Wei et al. 1996).

Die naszierende Polypeptidkette wird in vielen Fällen ko-translational durch N-Glykosylierung modifiziert. Die Faltung findet während der Verbindung am Ribosomen statt (Wei et al. 1996). Disulfidbrückenbindungen stabilisieren hierbei die Tertiärstruktur der Proteine. Unerwünschte Interaktionen während der Faltung sowie des Proteinaufbaus können zu Fehlfaltungen und/ oder Aggregationen führen.

Das endoplasmatische Retikulum nutzt ein raffiniertes Überwachungssystem, welches als ER- Qualitätskontrolle (ERQC) bezeichnet wird. Das ERQC unterstützt die Faltung und Modifikation der Membran- und sezernierten Proteine durch ER-assoziierte Degradation (ERAD) oder Autophagie (Araki et al. 2011).

Stimuli, welche die ER-Funktion stören, verursachen eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen innerhalb des ER-Lumens. Dieser Zustand wird als ER-Stress bezeichnet. Die „unfolded protein response“ (UPR) wird durch den ER-Stress aktiviert und versucht die ER-Homöostase wiederherzustellen. Die Homöostase erfolgt hauptsächlich durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Produktion von Chaperonen. Kann die Homöostase nicht wiederhergestellt werden, wird die Apoptose eingeleitet (Gupta et al. 2015, Fu et al. 2014).

Fehlgefaltete Proteine werden ausgesiekt und beispielsweise mit Ubiquitin zur Degradation gekennzeichnet. Dies dient der Sicherstellung der Qualitätskontrolle (Kulkarni et al., 2011, Fu et al. 2014).

Das Grundprinzip der Proteinfaltung in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und beim Menschen ist im Großen und Ganzen dasselbe. Liegt eine Störung bei einem Schritt der Proteinfaltung und/ oder Proteinabbau vor, führt dies zur Akkumulation des jeweiligen Proteins in der Zelle und schließlich zu Krankheiten wie Alzheimer, Huntington, Kreutzfeld-Jacob und Parkinson (Rothman et al. 2011).

1.3. Aspartylglukosaminidase (AGA)

Aspartylglukosaminidase (AGA, 1-aspartamido-beta-N-acetylglucosamine amidohydrolase) ist eine lysosomale Glykoasparaginase, die das Asparagin von N-Acetylglukosamin-Bindungen der Glykoproteine und –peptide hydrolysiert, was einen der letzte Schritte beim Abbau der Glykoproteine darstellt. Beim Menschen führt eine Störung innerhalb des Enzyms oder ein Mangel an AGA zur lysosomalen Akkumulationskrankheit Aspartylglukosaminurie oder AGU (Pollitt et al. 1968).

1.3.1. Struktur von AGA

Das ausgereifte Enzym besteht aus 2 Untereinheiten, einer 24-kDa und 17-kDa Untereinheit, welche heterogen glykosyliert sind. Das Vorläufer-Polypeptid wird direkt post-translational in eine Alpha- und Beta-Untereinheit im ER gespalten. Jeweils zwei Alpha- und Beta-Ketten bilden die heterotetramere Struktur (Tikkanen et al. 1996, Saarela et al. 1998). Die dreidimensionale Kristallstruktur der humanen AGA wurde mit 2.0 Å Auflösung bereits bestimmt (Oinonen et al. 1995). Das Molekül besitzt zwei fast identische heterodimere $\alpha\beta$ -Domänen. Der Kern der Domänen stellt ein $\alpha\beta\beta\alpha$ -Sandwich dar, in dem antiparallel β -Ketten zwischen α -Helices liegen. Der katalytisch

essentielle Rest, das N-terminale Threonin der β -Kette, befindet sich in der tiefen Tasche des trichterförmigen aktiven Zentrums. Das AGA-Protein besitzt 4 intramolekulare Disulfidbrücken. Zwei Disulfidbrücken pro Untereinheit liegen vor (Cys64[^]Cys69; Cys163[^]Cys179; Cys286[^]Cys306; Cys317[^]Cys345) (Riikonen et al. 1996).

Der obere Teil des Moleküls bildet C-terminale Loops, welche aus den beiden α -Untereinheiten gebildet werden und als AGU_{Fin}-Loops bezeichnet werden. Das heterotetramere AGA enthält zwei aktive Zentren, eins in jedem Alpha-Beta-Dimer. Die Kristallstruktur von AGA in einem Komplex mit dem Reaktionsprodukt, Aspartat, wurde mit 2.3 Å Auflösung bestimmt (Oinonen et al. 1995). Das aktive Zentrum von AGA beinhaltet Seitenketten beider Untereinheiten. Die drei-dimensionale Struktur ermöglicht die Voraussage der strukturellen Folgen von Mutationen, die bei Aspartylglycosaminuria (AGU), einer lysosomalen Speicherkrankheit, auftreten (Oinonen et al. 1995).

1.3.2. AGA- cDNA und -Gen

Die Gesamtlänge der AGA-cDNA beträgt 1041 bp. Diese kodiert für das Protein, welches 346 Aminosäuren enthält. Davon machen die 23 N-terminalen Aminosäuren das Signalpeptid aus. Das signalpeptidfreie Protein (Ser24-Ile346) weist eine Masse von 34,6 kDa auf (Fisher et al. 1990, Ikonen et al. 1993).

Das humane Gen für AGA wurde in der Chromosomen-Region 4q32-q33 lokalisiert und umfasst insgesamt 10688 bp (Grön et al. 1990, Morris et al. 1992). Das AGA-Gen (siehe Abbildung 3, entnommen von: Aronson et al. 1999) besitzt 9 Exons, welche durch Introns getrennt werden (Park et al. 1991). Wie auch bei vielen anderen Genen für lysosomale Hydrolasen beobachtet, ist die Promotorregion für AGA typisch für Haushaltsgene und weist eine GC-reiche Insel auf (Uusitalo et al. 1997).

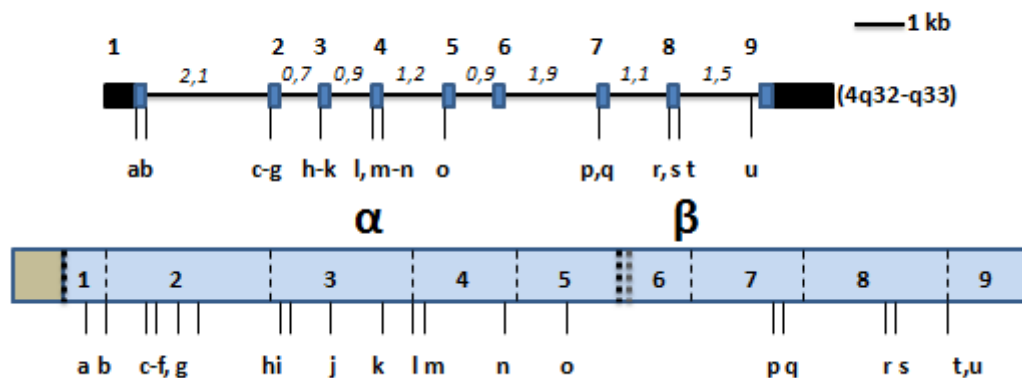


Abbildung 3: „Strukturen des humanen Glycosylasparaginase-Gens (AGA) und -Proteins mit der Lokalisation der AGU Mutationen“ modifiziert nach Aronson Jr. 1999: Das 13 kb große AGA-Gen ist in der Chromosomenregion 4q32-q33 lokalisiert. Die neun Exons werden durch Introns, deren Größe kursiv gezeigt wird, getrennt. Das Gen kodiert für ein 346-Aminosäuren-langes Polypeptid, welches 23 Aminosäuren für ein Signalpeptid aufweist.

1.3.3. Autokatalytische Aktivierung von AGA

AGA gehört zur Familie der N-terminalen nukleophilen Hydrolasen. Enzyme dieser Proteinfamilie werden von inaktiven Vorläufermolekülen ausgehend durch autokatalytisch-proteolytische Prozessierung aktiviert.

Die Dimerisierung von zwei inaktiven Vorläufermolekülen von AGA stellt das Ereignis dar, welches die autoproteolytische Aktivierung einleitet. Diese Dimerisierung der Polypeptide tritt kurz vor dem Ende der Faltung bzw. während der frühen Phasen der Faltung ein (Riikonen et al. 1996).

Das inaktive Vorläufer-AGA-Protein wird schnell in die α - und β -Untereinheiten gespalten. Die Seitenkette von Thr206 ist sowohl für die proteolytische Aktivierung als auch für die enzymatische Aktivität von AGA essentiell (Tikkanen et al. 1996, Saarela et al. 1998, Ikonen et al. 1993). Während der Freisetzung der α -Aminogruppe von Thr206 wird AGA aktiviert (siehe Abbildung 4).

Die α -Aminogruppe von Thr206, der N-terminale Rest der 17 kDa Untereinheit, ist ein ausschlaggebender Bestandteil der Katalyse. Diese stellt die Base dar, welche die Nukleophilie des Alkohol-Sauerstoffs von Thr206 steigert. Dies führt zur kovalenten Bindung des Carbonyl-Kohlenstoffes des Glycoasparagin-Substrates. Das negativ-geladene Carbonyl-Sauerstoffatom des Übergangszustands wird durch das „Oxyanion-Loch“ (*oxyanion hole*), welches von der OH-Gruppe von Thr257 gebildet wird, stabilisiert (Oinonen et al. 1995). Die Kohlenhydrate werden zunächst frei, und die kovalente Bindung zwischen Enzym und Asparagin wird durch eine Kettenreaktion,

welche durch die unprotonierte α -Aminogruppe des Thr206 ausgelöst wird, aufgelöst (Tikkanen et al. 1996).

His124 als Verbindungsstück zwischen den Heterodimeren ist ausschlaggebend für die thermodynamische Stabilität der oligomeren Struktur von AGA. Die korrekte Geometrie der His204-Asp205 Reste scheint ebenfalls bedeutend für die Aktivierung des AGA-Vorläuferpolypeptides zu sein (Tikkanen et al. 1996, Saarela et al. 1998).

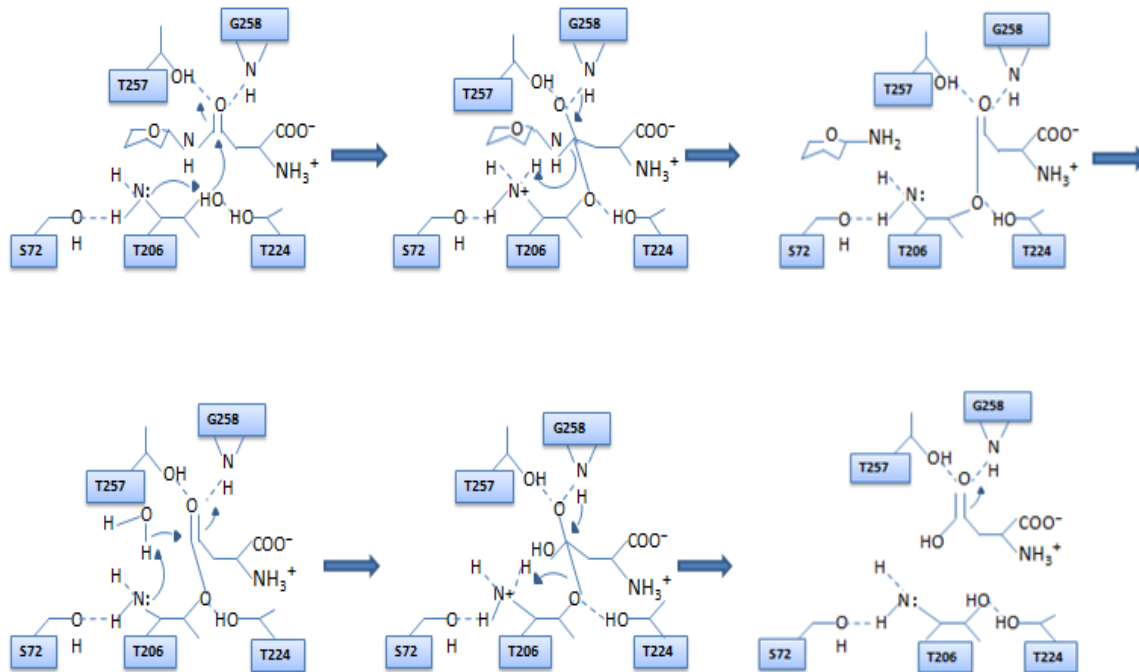


Abbildung 4: „Der katalytische Mechanismus von AGA“ modifiziert nach Tikkanen et al. 1995: Die Schlüsselemente der Katalyse sind das Nukleophil (Thr206 Alkohol-Sauerstoff), die Base (Thr206 α -Aminogruppe) und die Sauerstofflücke (OH-Gruppe von Thr257 und Hauptkette N von Gly258). Ser72 und Thr224 ändern die chemischen Eigenschaften von Thr206. Die α -Aminogruppe von Thr206 stellt die Base dar und erhöht die Nukleophilie der OH-Gruppe von Thr206, welche die Carbonylgruppe des Substrates angreift und zu einer kovalenten Enzym-Substrat-Übergangsbindung, welche durch die Sauerstofflücke stabilisiert wird, führt. Dieser Komplex bricht durch Addition von Wasser zusammen und Kohlenhydrat und Asparaginsäure werden frei.

1.4. Aspartylglukosaminurie (AGU)

Das AGA-Gen ist bei Patienten, die an Aspartylglukosaminurie (AGU) leiden, mutiert. Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit, die vor allem in der finnischen Bevölkerung auftritt und zur Entwicklungsstörungen führt (Saarela J et al. 2004, Peltola et al. 1998, Valkonen et al. 1999).

1.4.1. Pathogenese und Symptome von AGU

Die eingeschränkte AGA-Aktivität verursacht eine Ansammlung von Glykoasparaginen in den Lysosomen der Zellen (Haltia et al. 1975). Phenotypisch sind die Symptome von AGU bereits nach dem 2.- 3. Lebensjahr zu bemerken (Laitinen et al. 1997).

Das Hauptsymptom ist die progressive mentale Entwicklungsverzögerung. Die betroffenen Patienten sind schnell reizbar, und die meisten Erwachsenen weisen eine mittlere bis schwere geistige Einschränkung auf. In den Teenager-Jahren durchleben sie eine allmähliche Verschlechterung der geistigen und körperlichen Zustände. Häufig weisen sie epileptische Anfälle und psychische Störungen auf. Weitere Symptome sind die muskuloskeletalen Abnormalitäten, Bindegewebsdefekte und zahlreiche Entzündungssymptome (z.B. eine zunehmende Prävalenz von chronisch entzündlicher Arthritis). Die durchschnittliche Lebenserwartung der betroffenen Patienten liegt unter dem 45. Lebensjahr. Die auftretende Dysmorphologie der orofazialen Strukturen sind vielfältig und umfassen die Makroglossie, dentale Fehlvverzahnungen, eingeschränkte Mundöffnung, verkleinerte maxilläre Sinus, vergrößerte Lippen, Zahnfleischhyperplasien, einen verkleinerten Nasenrücken und ein breites Gesicht. Typische dentale Auffälligkeiten sind ein vermehrtes Auftreten von Gingivitis, Karies und odontogenen Tumoren. Faltige Gesichtshaut und Akne sind vermehrt bei erwachsenen Erkrankten nachgewiesen worden. Bei einigen Fällen wurden Angiokeratome diagnostiziert (Arvio et al. 1999).

1.4.2. AGU_{Fin-major}-und -minor-Mutationen

Die größte AGU-Prävalenz zeigt sich in der finnischen Bevölkerung und beträgt 1:18500. Hierbei handelt es sich um eine Missense-Mutation (Cys163Ser), die als AGU_{Fin-major}-Mutation bezeichnet wird (Arvio et al. 1999, Ikonen et al. 1991). Diese Punktmutation ist für 98% der AGU-Allele der Finnen verantwortlich. Die meisten finnischen Patienten sind homozygot bezogen auf das AGU_{Fin-major}-Allel. Ein kleinerer Anteil der Finnen weist eine AGU_{Fin-minor}-Mutation auf. Die Deletion, die bei dieser Mutation auftritt, führt zu einem fehlerhaft eingebauten Stop-Codon und somit zu einer reduzierten Transkript-Menge auf Grund des Abbaus der RNA. Es wurde diskutiert,

dass AGU_{Fin} an die angrenzenden Regionen von Nord-Schweden und Nord-Norwegen durch finnische Überträger transferiert wurde (Tollersrud et al. 1994).

1.4.3. Weitere AGU-Mutationen

Weitere AGU-Mutationen wurden charakterisiert, welche sehr familienspezifisch sind. Der Phänotyp der AGU-Patienten wird jedoch als relativ gleichartig beschrieben (Aula et al. 2001). Die zellbiologischen Konsequenzen der verschiedenen Mutationen führen meist zur Entstehung von eingeschränkten Polypeptiden oder inaktiven Enzymen (Ikonen et al. 1991, Peltola et al. 1998). Die bekannten AGU-Mutationen sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Die Mutationen umfassen die gesamte AGA cDNA, ausgenommen Exon 5. Das Spektrum der AGU-Mutationen beinhaltet Missense- und Nonsense-Mutationen, Deletionen, Insertionen und Splicing-Fehler (Saarela et al. 2004).

Die AGA Punktmutation T122K, bei der statt ACA AAA in der α -Untereinheit vorliegt, wurde bei 2 US-amerikanischen Brüdern (19 und 14 Jahre alt) nachgewiesen. Bei dieser Punktmutation zeigt sich eine mäßige Manifestation der Symptome von AGU. Frühe Hinweise haben sich in Form einer Krankheitsanfälligkeit und einem eingeschränkten Hörvermögen gezeigt. Im Alter von ca. 4 Jahren blieb das Sprechen trotz Sprachtherapie aus. Die Ärzte schlossen anfangs fälschlicherweise auf Autismus und ADHS. Erst nach genauer Untersuchung der Gensequenz wurde eine neue Punktmutation von AGU festgestellt (www.raretrait.com, 15.02.2016).

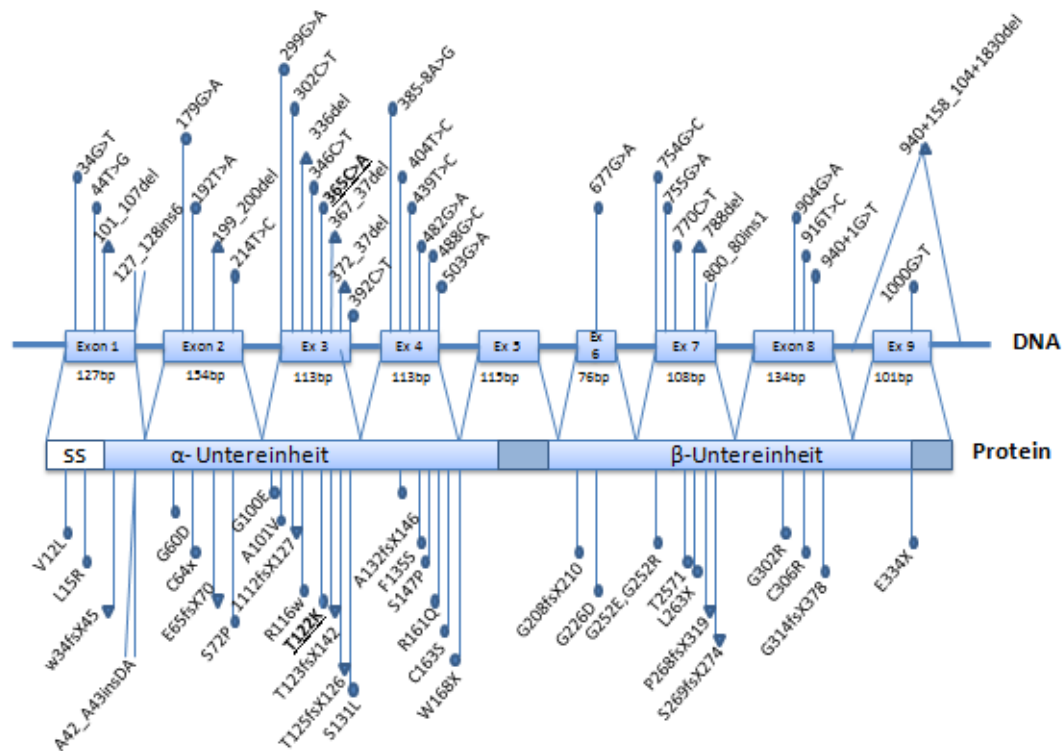


Abbildung 5: „Karte der bekannten AGU-Mutationen“ aktualisiert und modifiziert nach Saarela 2004: Nukleotidveränderungen sind oberhalb der Exons (hier auch abgekürzt mit „Ex“) abgebildet. Korrespondierende Veränderungen auf Polypeptid-Ebene sind unterhalb des AGA-Vorläufer-Polypeptides dargestellt. Substitutionen sind mit einem Punkt gekennzeichnet, und Deletionen mit Dreiecken versehen. Die Linien, die das Label mit dem Exon verbinden, stellen den Deletionsbereich dar. Insertionen sind mit zwei Linien markiert. Die T122K bzw. 365C>A-Mutation ist hier hervorgehoben.

1.5. Ziele der Arbeit

Eine neue Mutation, 365C>A, wurde im 3. Exon in der DNA zweier US-amerikanischer Brüder ermittelt. Auf Protein-Ebene führt die neue Mutation zu einer Aminosäure-Substitution T122K. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der T122K-Mutation an die zelluläre Lokalisierung, Prozessierung und Aktivität des AGA-Enzyms zu untersuchen.

Hierzu sollte die intrazelluläre Lokalisation des T122K-mutierten AGA-Polypeptides mittels Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt werden. Des Weiteren sollte die AGA cDNA in verschiedene Expressionsplasmide kloniert werden und die AGA-Expression und Prozessierung sowohl der T122K-Variante als auch des AGA-Wildtyp-Proteins mit Hilfe von Western Blots in primären Patienten-Fibroblasten und in HeLa- und HEK293T-Zellen untersucht werden, um feststellen zu können, inwieweit eine Prozessierung der

α - und β -Untereinheiten erfolgt. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit sind die fluorimetrischen AGA-Aktivitätsmessungen in Patienten-Fibroblasten.

2.Material

2.1. Materialien und Geräte

In der Doktorarbeit verwendete Materialien und Geräte mit dazugehörigen Herstellern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
CryoPure Röhrchen	Sarstedt,Nümbrecht (DE)
Deckgläschen (15 mm Durchmesser)	Menzel, Braunschweig (DE)
Entwickler Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Filter-Papier	Whatman, Dassel (DE)
Fluoreszenz-Mikroskop-LSM T-PMT 710	Carl-Zeiss, Göttingen (DE)
Frischhaltefolie	Papstar, Kall (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Glaskolben	Schott- AG, Mainz (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Inkubator	Sanyo, München (DE)
Laser-Scanning Mikroskop	Zeiss 510 Meta, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)
Neubauer-Zählkammer	Optik- Labor, Bad Homburg (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel (DE)
Objektträger	Roth, Karlsruhe (DE)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (Kanada)
Pipettierhilfe accu jet®	Brand, Wertheim (DE)
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl , 5, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Reaktionsgefäße (0,5 ,1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen

	(DE)
Schüttler (KS-15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spannungsquelle (Elektrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spektralphotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot (DE)
Tecan infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Ultraschall Homogenisator (Sonoplus)	Bandelin, Berlin (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602- S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Western-Blotsystem Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkultur-Flaschen	TPP, Trasdingen (CH)
Zellkultur-Platten (10 cm)	TPP, Trasdingen (CH)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	15 ml von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (DE), 50 ml von Falcon

2.2. Chemikalien und Puffer

Die in der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen sind mit deren Herstellern und den dazugehörigen Niederlassungen bzw. deren Zusammensetzung in den Tabellen 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
Agarose	Roth, Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem, Darmstadt (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe (DE)
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan)	Fluka, Neu-Ulm (DE)
Digitonin	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Marker	BioLabs, Frankfurt am Main (DE)
DTT (Dithiothreitol)	Applichem, Darmstadt (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt (DE)
Gelmount	Biomeda, Foster City, CA (USA)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt (DE)
Kanamycin	Roth, Karlsruhe (DE)
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)

Natriumacetat	Applichem, Darmstadt (DE)
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ponceau S	Applichem, Darmstadt (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Salzsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Sterilium classic pure	Dode, Hamburg (DE)
TEMED (Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris	Applichem, Darmstadt (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH
DMEM++	10% Fötales Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin
ECL Lösung (verstärkte Chemielumineszenz Lösung)	100 mM Tris HCl (pH 8,5) 1 mL 1,25 mM Luminol 440 µl 0,2 mM Cumarinsäure
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes (pH 6,8) 2 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA (pH 8) 4% PFA
Glycerol-Stock-Puffer	65% Glycerol

	0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris-HCl (pH 8)
Immunfluoreszenz Stripping Lösung (pH 2,9)	300 mM NaCl 200 mM Essigsäure
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB Medium
LB (Luria/Miller)-Medium	20 g LB broth 1 l dd H ₂ O
PBS 1x (Phosphat gepufferte Saline)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau-Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure
Proteinladepuffer (4x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 10% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 100 mM DTT 20% β-Mercaptoethanol
<u>SDS-Polyacrylamidgel:</u> Sammelgel (4%) Trenngel (10%)	4,2% Tris (pH 6,8) 0,1% SDS 4% Acrylamid 0,1% TEMED
	0,5% APS 12,5% Tris (pH 8,0) 0,1% SDS 10% Acrylamid 0,1% TEMED 0,5% APS
Stripp-Puffer alkalisch	0,1 M NaOH (pH 12,7)
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 015 M NaCl 2 mM EDTA

	1% NP-40
TBST (Tris buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA

2.3. Kits und Säulen

In Tabelle 4 sind die in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Invisorb Spin DNA Extraction Kit und Invisorb Fragment CleanUp (Mini-Prep.)	Strattec Biomedical AG, Birkenfeld (DE)
NucleoBond Xtra DNA purification (Midi-Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co, Düren (DE)

2.4. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

In den Tabellen 5-7 sind die in der Doktorarbeit für die Immunfluoreszenz und Western Blot eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sowie Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primärantikörper, den jeweiligen Verdünnungen und eingesetzten Volumina sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung *WB	Verdünnung *IF (+Fixierung)	Hersteller
AGA	Kaninchen	1:1000	/	Enogene
AGA	Kaninchen	/	1:150 (PFA)	von Prof. Dr. Tikkanen zur Verfügung gestellt
C-Myc	Maus	1:1000	/	Cell-Signaling,

				Danvers, MA (USA)
C-Myc	Kaninchen	/	1:25 (PFA)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (DE)
GAPDH	Maus	1:10 000	/	Abcam via Biozol, Eching, (DE)
LAMP 3	Maus	/	1:150 (in PFA)	SantaCruz, Heidelberg (DE)

*WB=Western Blot, *IF=Immunfluoreszenz

Tabelle 6: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung *WB	Verdünnung *IF	Hersteller
Alexa Fluor 488	Ziege anti Maus	/	1:300	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Cy3	Ziege anti Kaninchen	/	1:300	Dianova, Hamburg, (DE)
HRP	Ziege anti Kaninchen	1:10000	/	Dako, Hamburg, (DE)
HRP	Ziege anti Maus	1:10000	/	Dako, Hamburg, (DE)

*WB=Western Blot, *IF=Immunfluoreszenz

Tabelle 7: Bezeichnung des in der Doktorarbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes, der jeweiligen Verdünnung und dessen Hersteller

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
DAPI	1:1000	Merck, Darmstadt (DE)

2.5.Plasmide

Die eingesetzten Plasmide bzw. Konstrukte sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Hersteller

Konstrukt	Resistenz	Ursprung	Verwendete Restriktionsenzyme
pcDNA3	Ampicillin/ Neomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)	BamHI, XhoI
pCMV- Tag 5A	Kanamycin/ Neomycin	Stratagene, Böblingen (DE)	BamHI, Sall
pEXPR- IBA103	Ampicillin/ Neomycin	IBA GmbH, Göttingen, (DE)	XbaI, BamHI

2.6. Primer

Die eingesetzten Primer, ihre Sequenzen und Schnittstellen sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen, sowie deren Schnittstellen

Primer	Sequenz	Spezifität bzw. Schnittstellen
hAGA-β-stop-XhoI	5'CTATACTCGAGTTAGATGCAGTCCACTTTTTCC 3'	CTCGAG
hAGA-nonstop- BamHI-Fr0	5'CTATAGGATCCGATGCAGTCCACTTTTTCCC 3'	GGATCC
hAGA-nonstop-Sall- Fr0	5'CTATAGTCGACGATGCAGTCCACTTTTTCTC 3'	GTCGAC
hAGA-start-BamHI- Fr0	5'CTATAGGATCCGATGCAGTCCACTTTTTCTC 3'	GGATCC
hAGA-start-XbaI	5'CTATATCTAGAATGGCGCGGAAGTCGAACCTTG 3'	TCTAGA

2.7. Humane Zelllinien und Bakterienstämme

In Tabelle 10 sind die verwendeten Zelllinien sowie der eingesetzte Bakterienstamm mit weiterführenden Informationen aufgelistet.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien und des Bakterienstamms sowie deren Hersteller. Zusätzlich werden weitere wichtige Informationen aufgeführt.

Bezeichnung	Informationen	Quelle
HeLa-Zellen	Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen der afroamerikanischen Frau Henrietta Lacks	ATTC, Teddington (U.K.)
HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney)	Humane, embryonale Nierenzellen	ATTC, Teddington (U.K.)
Fibroblasten, Wildtyp	Humane Hautfibroblasten, immortalisiert	Von Ph.D.Steven Gray, University of North Carolina zur Verfügung gestellt
Fibroblasten der Patienten	Zellen mit AGU-Mutation	Von Ph.D.Steven Gray, University of North Carolina zur Verfügung gestellt
E.Coli (Escherichia coli)	Zur Vermehrung der Plasmidkonstrukte: XL1-Blue -Stämme;	Stratagene

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1. Kultivierung von HEK- und HeLa-Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit und in Zellkultur-Flaschen mit 5 ml Volumen an DMEM++ (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/l Glukose), welchem 10% FCS (Fötales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Der Zusatz von Penicillin und Streptomycin diente der Vorbeugung einer Kontamination.

3.1.2. Passagieren von HEK- und HeLa-Zellen

Bei einer Konfluenz von nahezu 100% wurden die Zellen wie folgt gesplittet: Nachdem das Medium verworfen wurde, erfolgte ein Waschgang mit 2 ml 1xPBS.

Anschließend wurden sie mit 500 µl 1xTrypsinlösung versetzt und bei 37°C für einige Minuten inkubiert. Die Trypsinlösung beinhaltet 3 verschiedene Peptidasen, welche die extrazellulären Proteine während der Inkubationszeit verdaute und somit die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen zerstörte. Dies wiederum führte durch Trypsin zur Ablösung der Zellen vom Zellgefäßboden.

Anschließend wurden ca. 2 ml DMEM++ zur Zellsuspension hinzugefügt und resuspendiert. Dadurch wurde die Verdauung durch die Peptidasen, welche unter alkalischen Bedingungen optimiert wirken, blockiert.

Die trypsinierten Zellen konnten auf andere Zellkulturflaschen ausgesät und für weitere Experimente genutzt werden. Der Rest wurde in einem bestimmten Verhältnis (je nach Geschwindigkeit des Wachstums und Zeitraum bis zur nächsten Passage) verdünnt und als Erhaltungskultur angelegt.

3.1.3. Transiente Transfektion von HEK- und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

Um die Expression des gewünschten Proteins in den jeweiligen Zellen zu erzielen, wurde die Plasmid-DNA mit dem codierenden Bereich des jeweiligen Proteins in die Zellen integriert. Hierzu verwendete man Lipofectamin 2000 (LF 2000), welches lipophil

ist und deswegen mit der hydrophoben Lipiddoppelschicht der Zellmembranen interagiert. Die Lipofectamine bilden spontan einen Lipid-Plasmid-DNA-Komplex und fusionieren mit der Zellmembran der HEK- und HeLa-Zellen, sodass es schließlich zur Einschleusung und Expression der Plasmid-DNA kommt.

Die Zellen wurden am Tag zuvor über Nacht auf einer 6-Well-Platte ausgesät, sodass sie eine Konfluenz von ca. 80% für die transiente Transfektion erreichten. Zunächst wurde das DMEM++ Medium gewechselt und die Zellen in den Inkubator zurückgestellt. Währenddessen wurden je zwei Ansätze hergestellt: Je 250 µl Optimem wurden mit 4 µl LF2000 (5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen) und je 250 µl Optimem mit 1 µg Plasmid-DNA vorbereitet. Hierbei war zu beachten, dass die Plasmid- und LF 2000-Menge individuell angepasst werden sollten. Sie variierten je nach Verträglichkeit der Zellen und des jeweiligen Plasmids. Der DNA-Ansatz wurde dem Lipofectamin-Ansatz zugesetzt und gemischt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation dieses Transfektionsgemisches bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten. Nach der Inkubationszeit wurden 500 µl des Transfektionsmixes tropfenweise pro Well hinzugegeben. Nach 5-6 h Inkubation bei 37°C wurde die Transfektion durch Wechsel des Mediums gegen 2 ml frischem DMEM++ gestoppt.

Am darauffolgenden Tag standen die transient transfizierten Zellen für weiterführende Versuche zur Verfügung.

3.1.4. Stabile Transfektion von HEK- und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

Bei einer transienten Transfektion wurde die eingebrachte Plasmid-DNA bereits nach einigen Tagen abgebaut oder hinausgeschleust. Um eine langfristige Expression des Proteins zu erzielen, mussten die mit pCDNA3-Konstrukten transfizierten HeLa- und HEK-Zellen positiv selektiert werden. Hierfür wurde das Gift G418 (800 µg/ml), welches dem Antibiotikum Neomycin ähnelt, verwendet. Die Zellen, welche die Plasmid-DNA mit dem gewünschten Gen durch homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben, erlangten auf diese Weise eine Resistenz gegen G418. Die Zellen wurden in einem Selektionsmedium mit G418 kultiviert, sodass das Überleben der Zellen, welche das gewünschte Plasmid nicht eingebaut hatten, verhindert wurde. Die überlebenden Zellen waren mit großer Wahrscheinlichkeit die das gewünschte Protein stabil exprimierenden Zellen. Die auf der 6-Well-Platte transient transfizierten Zellen wurden nach 24 h auf einer 10 cm- Schale bzw. in Zellkulturflaschen umgesetzt und unter

Selektionsmedium gehalten. Hierbei sollte das Medium inkl. G418 ca. alle 3-4 Tage gewechselt werden, bis sich sichtbare vereinzelte Kolonien gebildet hatten.

3.1.5. Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die entsprechenden Zellen wurden trypsinisiert und die Reaktion mit dem Medium DMEM++ abgestoppt. Anschließend wurden diese für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem entstandenen Pellet wurde ca. 1-2 ml FCS + DMSO (10%) zugesetzt. Zügig wurde die Suspension dann in Cryo-Röhrchen überführt und zum Schutz der Zellen möglichst zügig bei -150 °C eingefroren.

Bei Bedarf wurden die jeweiligen Zellen folgendermaßen aufgetaut: Zunächst wurde der Inhalt der Cryoröhrchen in ca 10 ml DMEM++ in 15 ml Röhrchen gegeben. Für 5 Minuten bei 1000 rpm wurden die Zellen als Pellet abzentrifugiert und der Überstand anschließend entsorgt. Die Pellets wurden durch Zugabe von DMEM++ resuspendiert und in Flaschen überführt. Schließlich wurden diese im Brutschrank aufbewahrt.

3.1.6. Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung ist es möglich, Proteine innerhalb einer Zelle durch fluorochromgekoppelte Antikörper zu lokalisieren. Hierfür wurden zunächst die HEK- und HeLa-Zellen auf Deckgläschen (coverslips) in einer 12-well-Platte ausgesät und bei einer Konfluenz von ungefähr 80% 2x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder in eiskaltem 100% Methanol für 10 Minuten bei -20°C oder in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die Deckgläschen für einige Tage in 1xPBS bei 4°C gelagert oder direkt gefärbt. Während des Färbevorganges wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette vorsichtig in eine feuchte Färbekammer gelegt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Deckgläschen mit je 30 µl 1% Rinderserumalbumin/ 1xPBS bei RT für 10 Minuten blockiert. Im Falle einer PFA-Fixierung der Zellen wurde durch Zugabe von Digitonin (50 mg/ml in DMSO) in einem Verhältnis von 1:1000 die Membran für 15 min bei RT permeabilisiert. Die Blockierungslösung wurde nach der Inkubationszeit entfernt und anschließend der jeweilige Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 5) für 1 h bei RT auf die Deckgläschen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem 1x PBS für je 10 Minuten erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT mit den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern

(s.Tabelle 6). Der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) mit einer Verdünnung von 1:1000 wurde ebenfalls dazugegeben. Dieser bildet Komplexe mit der doppelsträngigen DNA und färbt auf diese Weise den Zellkern an. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit kaltem 1xPBS für je 10 Minuten, und anschließend wurden die Deckgläschen einmal für einen kurzen Moment in dest. Wasser getaucht. Daraufhin wurden sie in Gelmount und DABCO eingedeckelt und dadurch auf Objektträgern fixiert. Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops erfolgten die Aufnahmen.

3.2. Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1. Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zunächst wurde die RNA aus Hela-Zellen in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Ohne diesen Vorgang, der als Reverse Transkription bezeichnet wird, kann die RNA nicht als PCR-Matrize genutzt werden. Eingesetzt wurde ein 26 µl Ansatz (2 µg bzw. 9 µl RNA, 2 µl Oligo dTPimer, 3 µl dNTP-Mix, 12 µl DEPC-Wasser), welcher bei 70°C für 4 Minuten erhitzt wurde, sodass bestehende Sekundärstrukturen aufgeschmolzen wurden. Anschließend wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert. Daraufhin wurde dem Gemisch 8 µl 5x MMuIV RNaseH-Reaction buffer, 4 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl MMuIV (Reverse Transkriptase, Invitrogen, Karlsruhe (DE)) dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 42°C und die Transkriptase wurde dann bei 80°C und 5 Minuten inaktiviert. Davon wurde die Hälfte (20 µl) in ein neues Eppi gegeben und als Reserve bei -20°C eingefroren.

Die DNA-Amplifikation durch PCR erfolgte mit der Phusion-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe (DE)). Der PCR-Ansatz bestand aus 0,5 µl cDNA, 13,3 µl DEPC-H₂O, 0,5 µl Primer1 (100 µM), 0,5 µl Primer2 (100 µM), 0,4 µl dNTPs, 4 µl 5x Phusion HF-Buffer, 0,6 µl DMSO und 0,2 µl Phusion Polymerase. Nachdem die Template-DNA einmalig bei 98°C für 30 s denaturiert wurde, folgte ein Denaturierungsschritt für 10 s bei 98°C und ein Annealing-Schritt bei 60°C für 20 s. Die Synthese fand bei 72°C für 45 s statt. Der Zyklus wurde 35-mal wiederholt.

3.2.2. Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte

Nach der DNA-Amplifikation durch PCR wurden die Proben der Nukleinsäuren mit Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines Größenstandards konnte man die Größe der jeweiligen Proben bestimmen. Das kanzerogene Ethidiumbromid, welches in Nukleinsäuren interkaliert, dient der Visualisierung der DNA-Proben durch UV-Licht. Zur Extraktion und Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel wurde das Gel-Extraktions-Kit (von Invitex, siehe Tab. 4) verwendet. Entsprechend der Anleitung wurde die DNA in 25 µl Wasser eluiert.

3.2.3. Restriktionsspaltung von Vektor und PCR-Fragment

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden Verdauungen mit Enzymen der Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Stratagene (Böblingen) und IBA GmbH (Göttingen) durchgeführt.

Die Spaltung des jeweiligen Vektors (5 µg) erfolgte mit 5 µl 10x NEB- Puffer, jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme und DEPC-H₂O auf 50 µl für mindestens 1 h bei 37°C. Anschließend wurde die Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C durchgeführt. Die Ansätze wurden dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, der geschnittene Vektor wurde ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Dieser wurde in 40 µl Wasser eluiert.

Die Insertspaltung wurde mit 20 µl Insert, 4 µl 10x NEB- Puffer, jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme und 14 µl DEPC H₂O für eine 1 h bei 37°C und einer anschließenden 20 minütigen Hitzeinaktivierung bei 65°C durchgeführt.

Die Entfernung der 5'-ständigen Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors wurde mit 2 µl Rapid-Phosphatase (Roche, Mannheim), 20 µl geschnittenen Vektor, 3 µl 10x Puffer für die Phosphatase, 5 µl DEPC- H₂O für 30 min bei 37 °C und für 3 min bei 75°C durchgeführt.

3.2.4. Ligation und Transformation

Die aufgereinigte DNA wurde in den jeweiligen Vektor folgendermaßen ligiert: 1 µl geschnittener, dephosphorylierter Vektor (ca. 100 ng), 5 µl geschnittenes Insert, 1 µl 10x Ligasepuffer, 0,5 µl Ligase und 2,5 µl DEPC H₂O wurden angesetzt und für 12 h bei 16°C inkubiert. Zu Beginn der Transformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenten E.coli für 30 min auf Eis gemischt. Anschließend erfolgte ein

Hitzeschock für 40 s bei 42°C. Daraufhin wurde der Ansatz direkt auf Eis für 2 min gelegt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Zusammensetzung: Trypton 1 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Magnesiumsulfat 5 g/l, Natriumchlorid 0,5 g/l, Kaliumchlorid 0,186 g/l pH 7,0, Glucose 20 mM) auf die Zellen. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden die transformierten Zellen auf selektiven LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5. Plasmidpräparation (Mini)

Nachdem Einzelkolonien von den jeweiligen Agarplatten gepickt wurden, wurden diese in ein 15-ml-Röhrchen mit je 5 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem Röhrchen über Nacht bei 37°C bei 225 rpm im Schüttelinkubator.

Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert. Zunächst wurde je 2 ml der Bakteriensuspension in je 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 13000 – 14000 rpm. Die Überstände (Medium) wurden im Anschluss verworfen. Weitere 2 ml Bakteriensuspension wurden auf das jeweilige Pellet gegeben und wiederum zentrifugiert. Die aus 4 ml Bakteriensuspension zusammengesetzten Pellets wurden dann in je 100 µl Resuspensionspuffer (P1 = bestehend aus 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) durch vortexen resuspendiert, bis keine Klumpen mehr sichtbar waren. Anschließend erfolgt die Zugabe von je 100 µl Lysepuffer (P2= bestehend aus 200 mM NaOH, 1% SDS) und das fünfmalige Schütteln der Eppendorfgefäße. Es folgte die Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer (P3 = bestehend aus 3 M Kaliumacetat pH 5,5) und erneutes fünfmaliges Schütteln. Eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 13000 - 14000 rpm erfolgte. Die Überstände wurden erneut verworfen. Im Anschluss wurde je 200 µl 70% Ethanol dazugegeben. Erneut wurde für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und Überstand verworfen. Für ca. 20 min erfolgte dann das Trocknen der DNA in den Eppendorfgefäßen. Die entstandenen Pellets wurden dann in je 50 µl DEPC H₂O gelöst.

Dann erfolgte eine Kontrollspaltung von je 3 µl Minipräp mit 0,2 µl Restriktionsenzym indem 10 µl Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden diese mit Ladepuffer auf ein Agarosegel geladen. Die positiven Klone wurden zum Sequenzieren

zu MWG-Biotech eingeschickt, um die erfolgreiche Klonierung durch die Sequenzierungsergebnisse zu bestätigen.

3.2.6. Plasmidpräparation (Midi)

Eine Bakterienkultur für eine größere Plasmidpräparation (Midi) wurde dann angesetzt, wenn die jeweiligen Klone das gewünschte Insert in richtiger Richtung und ohne Mutation enthielten. Dies wurde mit Hilfe von Sequenzvergleichen der Klone ermittelt. Es wurden 100 ml LB-Medium mit dem selektiven Antibiotikum in einem Erlenmeyerkolben versetzt. Daraufhin wurden die E. coli-Bakterien, welche das gewünschte Plasmid enthalten, dazugegeben und bei 37°C und 225 rpm über Nacht geschüttelt.

Am nächsten Tag erfolgte dann die Isolierung des Plasmids nach dem Protokoll „NucleoBond Xtra DNA purification (Midi-Prep.)“ der Firma Macherey.

3.2.7. Zellysatherstellung aus HEK-und HeLa-Zellen

Durch Aufschluss der Zellen werden die gewünschten Proteine extrahiert und können biochemisch untersucht werden.

Während der Herstellung der Zellysate wird auf Eis gearbeitet. Zunächst wurden die konfluent bewachsenen Zellkultur-Platten mit je 2 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Danach wurde das PBS wieder abgesaugt und je 250 µl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Verdünnungsverhältnis 1:100) auf die Zellplatten gegeben. Anschließend wurden die Platten auf Eis für 10 min geschwenkt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen dann vom Zellkulturgefäß abgeschabt und die Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach einer 20-minütigen Lyse auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15 000 rpm und +4°C, sodass die unlöslichen Zellbestandteile entfernt wurden. Der Überstand und somit das Lysat wurde dann in neue Eppendorfgefäße überführt.

3.2.8. Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration

Da die Zellysate unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufweisen, wurden diese vor dem Auftragen auf SDS-Gele wie folgt bestimmt. Pro Probe wurden 800 µl Milli-Q-Wasser mit je 5 µl Lysat gemischt und dann 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben. Bei

einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer erfolgte die Konzentrationsmessung der Proben. Der eingesetzte Lysepuffer diente hierbei als Referenz. Damit die Proben in der Weiterverwendung verglichen werden konnten, glich man die Konzentrationen der jeweiligen Lysat-Proben aneinander an.

3.2.9. SDS-PAGE

Mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Gelelektrophorese mit Sammel- und Trenngel nach Laemmli. Die Funktion des Sammelgels besteht darin, die Proteine auf einer Höhe aufzusammeln, sodass diese dann der Größe entsprechend aufgetrennt werden. Nachdem die Proben mit 4x Ladepuffer, welcher bereits SDS und DTT besitzt, versetzt wurden und bei 94°C gekocht und somit denaturiert wurden, wurde das 10%ige SDS-Gel (s. Tabelle 3) mit den vorbereiteten Proben beladen. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an Proteine an, denaturiert sie und gibt ihnen eine negative Ladung. Diese negativ geladenen Komplexe laufen dann zur positiv geladenen Anode.

Im 1x Lämmli-Laufpuffer (s. Tabelle 3) erfolgte dann die Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe bei 220 V für mind. 1 h und 15 mA je Gel. Ab dem Trenngel wurde die Apparatur auf 20 mA hochgestellt und 1 cm vor Ende des Gels der Vorgang gestoppt.

3.2.10. Western-Blot

Nachdem die Proteine auf einem SDS-Gel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt wurden (s. Abschnitt 3.2.9), erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran. Dabei wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Dadurch wanderten die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran, an dessen Oberfläche die Proteine aufgrund von hydrophober Wechselwirkungen hafteten. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung blieb auf diese Weise erhalten.

Hierbei befanden sich alle Transferbestandteile in einer Blotkammer, die mit 1x Blotsalz (s. Tabelle 3) gefüllt war. Auf jede Seite des Plastikgitters wurden jeweils ein Schaumstoffschwamm und ein Filter-Papier gelegt. Dazwischen lagen das SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran.

Der Transfer erfolgte dann bei 220 V, 400 mA und für 1 h. Zur Kontrolle, ob der Transfer gelungen war, wurden die membrangebundenen Proteine mit dem Farbstoff Ponceau S unspezifisch detektiert. Nach ca. 10 s waren die Proteinbanden visualisiert.

3.2.10.1. Detektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden die freien, unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 5%iger Blockierungslösung aus Milchpulver in 1x TBST (s. Tabelle 3) für 30 min blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag folgten 3 Waschschrte mit 1x TBST je 10 min. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivate) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut 3x je 10 min mit 1x TBST gewaschen. Um die Peroxidasereaktion zu initiieren, wurde zu 2 ml ECL-Lösung (s. Tab. 3) 2 µl 10%iges H₂O₂ gegeben und 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran abgetrocknet und in eine Röntgenkassette geklebt. Abhängig von der Signalstärke wurde ein Röntgenfilm 1 s-30 min auf der Membran belassen.

3.2.10.2. Strippen

Für weitere Immundetektionen können die Nitrocellulosemembranen auch gestrippt werden. Hierbei müssen die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Zunächst wurde die Membran für 5 min in 0,1 M NaOH und anschließend für 5 min in dest. Wasser gewaschen. Dies führte zur Denaturierung und Entfernung der gebundenen Antikörper. Nach einem 5-minütigen Waschschrte mit 1x TBST wurde die Membran mit 5%iger Milchpulverblocklösung gewaschen, so dass dadurch die unspezifischen Bindungsstellen blockiert wurden. Damit war die Nitrocellulosemembran für weitere Immundetektionen zugänglich.

3.3. Aktivitätsassays

3.3.1. Photometrische AGA-Aktivitätsbestimmung (nach Tikkanen et al. 1995)

Dieser Aktivitätsassay basiert auf einer kolorimetrischen Messung. Vorerst wurde das entsprechende Zelllysate mit AADG (2-Acetamido-1- β -(L-aspartamido)-1, 2-dideoxy- β -D-Glucose; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) versetzt. Dieser Ansatz hatte eine finale Konzentration von 2 nM AADG. Außerdem wurde 67 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,0) dazugegeben, sodass ein finales Volumen von 50 μ l erreicht wurde. Für 18 h erfolgte dann eine Inkubation bei 37°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 107 μ l 0,8 M Boratpuffer (pH 8,8) und anschließend Abkochen für 5 min bei 100°C gestoppt. Danach wurden die Proben kurz auf Eis gelegt und 5 Vol. des DMAB-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagenz; 1 g DMAB pro 10 ml Eisessigsäure, 12,5% 10 N-HCl) wurden hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurden die Proben dann gemischt und für genau 20 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich erfolgte die OD-Messung bei 585 nm.

Dieser Assay erwies sich als nicht ausreichend sensitiv.

3.3.2 Fluorimetrischer AGA-Aktivitätsassay (Voznyi et al. 1993, Mononen et al. 1993)

Die Zellen wurden wie unter 3.2.6 beschrieben lysiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Ansätze bestehend aus 10 μ l des Zelllysates (20 - 30 μ g Protein) und 20 μ l 50 μ M Asp-AMC (in McIlvains pH 6,5) wurden 23 - 24 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l McIlvains pH 4,5 gestoppt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt dann mit einer Exzitation von 355 nm und Emission von 460 nm. Zuletzt erfolgte die Berechnung der Aktivitäten und deren Angabe in μ mol umgesetztes Substrat pro g Protein.

3.3.2.1. Reagenzien

- L-Aspartic acid β -(7-amido-4-methylcoumarin), Asp-AMC: Santa Cruz sc-211699 (1,5 mM in McIlvain's Puffer pH 6,5)
- 7-Amino-4-Methylcoumarin: Sigma Aldrich A9891 (Standardreihe aus 8 Standards in McIlvain's Puffer pH 4,5 angesetzt)
- McIlvain's Phosphat-Citrat-Puffer pH 4,5
- McIlvain's Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,5

Tab.11: Zusammensetzung des McIlvains Phosphat/Citratpuffers

0, 2 M Na ₂ HPO ₄ / ml	0, 1 M Zitronensäure/ ml	pH
20, 55	79, 45	3, 0
38, 55	61, 45	4, 0
51, 50	48, 50	5, 0
63, 15	36, 85	6, 0
82, 35	17, 65	7, 0
97, 25	2, 75	8, 0

3.4. Statistik

Die Experimente dieser Doktorarbeit wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Für die statistischen Analysen wurden die Proben für die Western Blots mit Hilfe der Quantity One Software (Biorade Hercules, USA) densitometrisch quantifiziert. Statistische Analysen (zweiseitiger Anova mit Bonferroni Posttest) wurden mit der GraphPad Prism Software (Version 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung von AGA-T122K und WT-AGA in die Plasmide: pEXPR-IBA-103, pCMV-Tag-5A und pcDNA3

Um die Auswirkung von AGU-Mutationen zu untersuchen, war es nötig, die entsprechenden Varianten des AGA-Enzyms als DNA-Konstrukte zu generieren. Zunächst erfolgte die cDNA-Synthese von Wildtyp-AGA mittels RNA aus HeLa-Zellen. Die AGA-T122K cDNA lag bereits vor. Anschließend wurden mit Hilfe von Polymerase-Kettenreaktionen der kodierende Bereich der AGA-T122K- und WT-cDNAs amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Bei circa 1000 bp ist die DNA des Wildtyp- und T122K-AGAs nachgewiesen.

Im Anschluss wurde die DNA aus dem Agarosegel extrahiert und die Restriktionsspaltung der Vektoren (pEXPR-IBA-103, pCMV-Tag-5A und pcDNA3) und der PCR-Fragmente durchgeführt. Der Vektor pCMV-Tag-5A trägt einen Myc-Tag am C-Terminus des einklonierten Proteins, während pEXPR-IBA-103 ein Streptag besitzt. Der pcDNA3-Vektor hingegen besitzt kein Tag. Es wurden entsprechende DNA-Konstrukte hergestellt. In Abbildung 6 ist die Gelelektrophorese des AGA-Wildtyps und AGA-T122K nach einem Restriktionsverdau zu sehen. Die erfolgreiche Klonierung von mutiertem AGA-T122K und AGA-WT wurde anhand der Sequenzierungsergebnisse bestätigt (Abbildung 7).

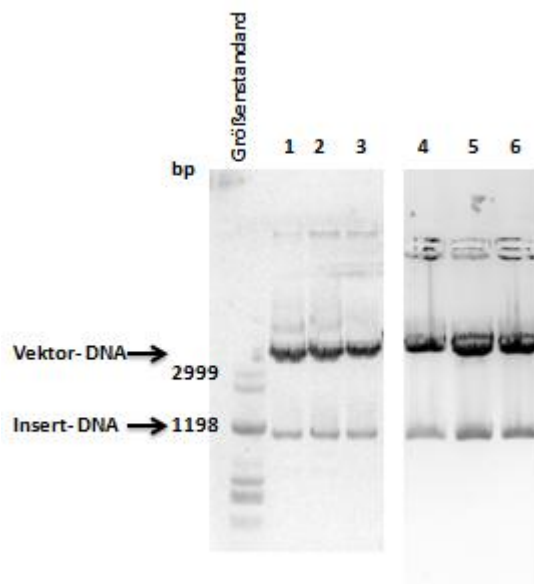


Abbildung 6: Agarosegelelektrophorese von AGA-WT (Spuren 1-3) mit pcMV-tag-5a und AGA-T122K (Spuren 4-6) mit pEXPR-IBA-103 als Vektor: Bei ca. 3100 bp (=Basenpaare) ist die Vektor-DNA zu sehen. Die AGA-WT (1-3) und AGA-T122K-DNA, hier als „Insert-DNA“ beschriftet, wird bei ca. 1000 bp detektiert. Es sind jeweils 3 Klone der AGA-WT-und AGA-T122K-DNA dargestellt.

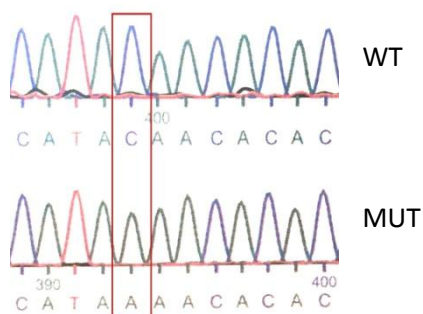


Abbildung 7: DNA-Sequenzen von AGA-WT im Vergleich zu AGA-T122K-Punktmutation: In den Sequenzen ist die Punktmutation von AGA-T122K (A statt C) im Vergleich zum AGA-Wildtyp zu sehen.

4.2. Expression von AGA-T122K in unterschiedlichen Zellen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Auswirkungen der AGU-Mutation-T122K unter anderem mit Hilfe der Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Der folgende Abschnitt befasst sich nun mit der Frage, ob und wie weit die Vorstufe des AGAs prozessiert wird im Vergleich zu dem Wildtyp-AGA. Für den Nachweis mittels WB wurden HeLa bzw. HEK293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, drei Tage nach Transfektion lysiert und mittels SDS-PAGE

aufgetrennt. Anschließend wurden die AGA-Proteine (Mutanten und Wildtypen) und das Haushaltsgen GAPDH als Ladekontrolle detektiert.

4.2.1. Expression von AGA-T122K-myc in transient transfizierten HEK-Zellen

Um das Expressionslevel von AGA-T122K-myc im Vergleich zu AGA-WT auf Proteinebene zu untersuchen, wurden WB durchgeführt. Für den Nachweis mittels WB wurden sowohl von AGA-T122K-myc als auch vom WT in HEK293-Zellen zunächst Lysate hergestellt. Anschließend wurde AGA detektiert. Dabei ist das unprozessierte AGA-Protein bei einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa, die α -Untereinheit von ca. 24 kDa, die β -Untereinheit von ca. 15 kDa, und das als Ladekontrolle verwendete GAPDH-Protein ist bei 37 kDa zu erwarten.

In Abbildung 8 ist zu sehen, dass das myc-getaggte AGA nicht prozessiert wird. Bei ca. 40 kDa wird eine Akkumulation des unprozessierten AGA-Vorläufers deutlich. Es sind jeweils zwei unterschiedliche Klone (A und B, Plasmid- DNA von zwei verschiedenen Bakterienkolonien) auf einem Gel dargestellt. Offensichtlich verhindert das Myc-Protein die korrekte Prozessierung von AGA. Das Plasmid pCMV-Tag-5A scheint für die AGA-Expression somit nicht geeignet zu sein

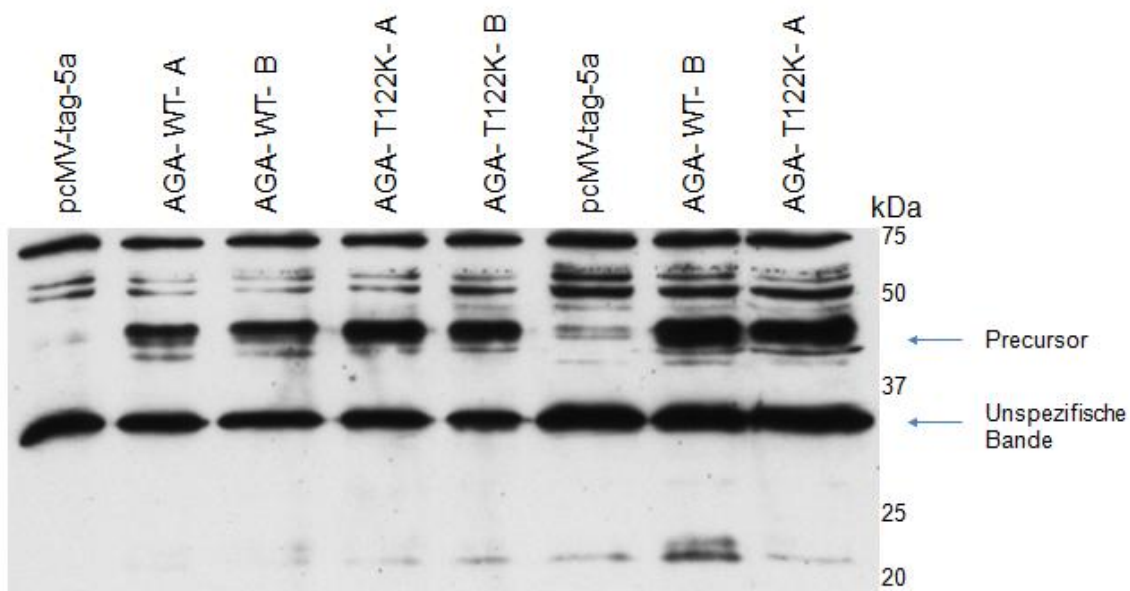


Abbildung 8: Western-Blot von pCMV-tag-5a, AGA-WT A, AGA-WT B, AGA-T122K- A und AGA-T122K- B: Der Leervektor (pCMV-tag-5a), AGA-WT- A, AGA-WT- B und die beiden AGA-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Jeweils 30 μ g Gesamtprotein wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss der Immundetektion mit AGA-Antikörper wurde der Film entwickelt. Der unprozessierte AGA-Verläufer („Precursor“) und die unspezifische Bande sind hier gekennzeichnet (\leftarrow).

4.2.2. Expression von AGA-T122K-pCMV-tag-5A in HeLa-Zellen

Dasselbe Ergebnis wie aus 4.2.1. ergab sich ebenfalls bei der Durchführung mit HeLa-statt HEK-Zellen. Auch hier wird deutlich, dass das myc-getaggte AGA nicht prozessiert werden kann. Die Akkumulation des unprozessierten AGAs ist bei etwa 40 kDa ebenfalls zu vermerken (Abbildung 9). Die in der Abbildung 9 beobachtete Bande für die α -Untereinheit stammt aus dem endogenen AGA-Enzym, da sie auch bei den mit Leervektor transfizierten Zellen anwesend ist.

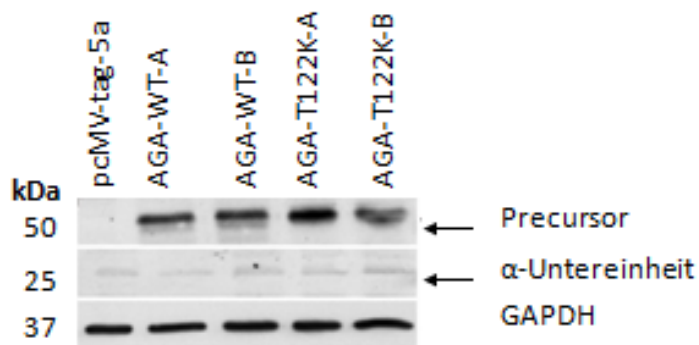


Abbildung 9: Western-Blot von pCMV-tag-5a, AGA-WT A, AGA-WT B, AGA-T122K-A und AGA-T122K-B: Die Zahlen A und B kennzeichnen unterschiedliche Plasmid-DNAs aus verschiedenen Bakterienkolonien. Der Leervektor (pCMV-tag-5a), AGA-WT-A, AGA-WT-B und die beiden AGA-Mutanten wurden in HeLa-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt. Jeweils 30 μ g Gesamtprotein wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss der Immundetektion mit AGA-Antikörper und GAPDH (als Ladekontrolle) wurde der Film entwickelt. Das unprozessierte AGA (Vorläufer= Precursor) und das prozessierte AGA (hier nur die α -Untereinheit sichtbar) sind gekennzeichnet (\leftarrow).

4.2.3. Expression von AGA-T122K-pcDNA3 in stabil transfizierten HeLa-Zellen

Nach der Transfektion der AGA-pcDNA3-Konstrukte (ohne Tag) wurden stabile HeLa-Zellen hergestellt. Zelllysate aus den stabil transfizierten HeLa-Zellen wurden gewonnen und erneut Western Blots (hier: Immundetektion mit α -AGA-rb-EnoGene Antikörper) durchgeführt.

In Abbildung 10 ist deutlich zu erkennen, dass das T122K-AGA (α -Untereinheit) kaum prozessiert wird und dass sich das unprozessierte mutierte AGA bei ca. 40 kDa ansammelt, wohingegen das Wildtyp-AGA prozessiert wird. Hier ist nur die α -

Untereinheit bei ca. 25 kDa detektierbar. Die β -Untereinheit ist meist nicht zu erkennen, da sie vermutlich zu klein ist oder die Detektion dieser Untereinheit durch den AGA-Antikörper eingeschränkt ist. Die unspezifische Bande bei ca. 37 kDa war bei jeder durchgeführten Detektion zu sehen. Dies ist wahrscheinlich auf ein partiell unspezifisches Erkennungspotential des AGA-Antikörpers zurückzuführen.

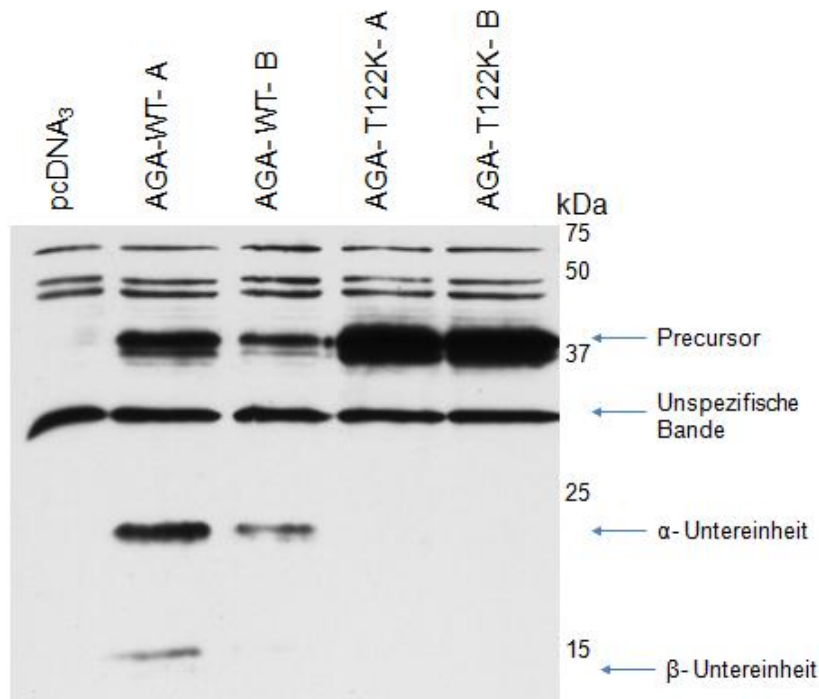


Abbildung 10: Western-Blot von pcDNA3, AGA-WT und AGA-T122K in HeLa-Zellen: Der Leervektor (pcDNA3), AGA-WT sowie AGA-T122K wurden stabil in HeLa-Zellen transfiziert. Jeweils zwei stabil transfizierte Zellpopulation (A und B) wurden analysiert. Jeweils 30 μ g Gesamtprotein wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss fand die Immundetektion mit α -AGA-Antikörper und GAPDH statt. Schließlich wurde der Film entwickelt. Das unprozessierte AGA (Vorläufer= Precursor), das prozessierte AGA (hier nur die α -Untereinheit sichtbar) und eine unspezifische Bande bei ca. 37 kDa sind gekennzeichnet (\leftarrow).

Als nächstes wurde die Lokalisation der exprimierten Polypeptide untersucht (Abbildung 11). Auf diesen IFs der stabilen pcDNA3-HeLa-Zellen wird deutlich, dass der Unterschied zwischen Leervektor und AGA-transfizierten Zellen kaum zu erkennen ist und die hohe Menge an endogenem AGA in den Lysosomen dieser Zellen eine Charakterisierung bzw. Lokalisation des transfizierten T122K-AGAs unmöglich macht. Ein Unterschied zwischen Menge und Lokalisation des transfizierten WT und T122K-

AGA ist daher nicht zu erkennen. LAMP3-Gegenfärbung wurde zur Visualisierung von späten Endosomen/Lysosomen durchgeführt.

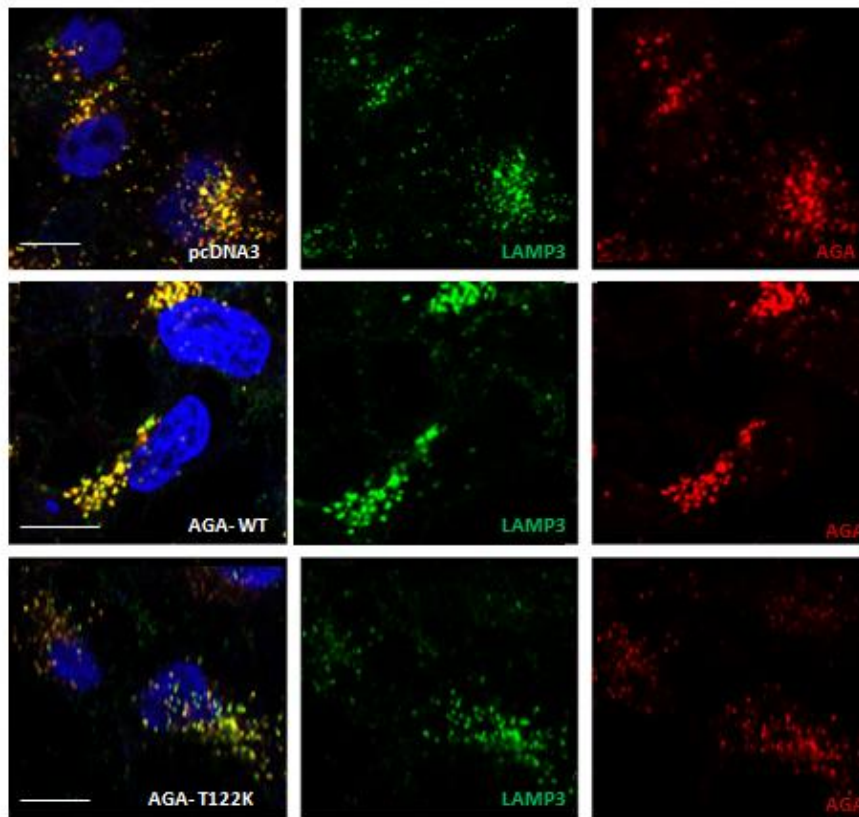


Abbildung 11: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in stabilen HeLa-Zellen (pcDNA3): Für die Immunfluoreszenz wurden stabil transfizierte HeLa-Zellen kultiviert. Diese wurden mit eiskaltem MeOH fixiert. Die Markierung der Lysosomen erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen LAMP3 (hier grün zu sehen). Das AGA wurde ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper markiert (rot). Die Zellkerne wurden mit dem dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert (blau). Maßstab = 10 µm.

4.2.4. Expression von AGA-T122K in Hautfibroblasten (Wildtyp und T122K-Mutation)

Es wurden weitere Färbungen des WT und T122K-AGAs mit Hautfibroblasten der beiden Patienten und in Kontrollzellen (Fibroblasten einer gesunden Person) durchgeführt. Aus Kontroll- sowie Patienten-Fibroblasten wurden Lysate erstellt, nach Bradford die Proteinkonzentrationen bestimmt und anschließend mittels Western Blot analysiert.

In Abbildung 12 wird wieder bestätigt, dass das mutierte AGA kaum prozessiert wird (siehe α -Untereinheit) und das unprozessierte mutierte AGA sich bei ca. 40 kDa anhäuft. Das WT-AGA wird exprimiert und prozessiert. Hier ist nur die α -Untereinheit bei ca. 25 kDa detektierbar. Die β -Untereinheit ist nicht zu erkennen.

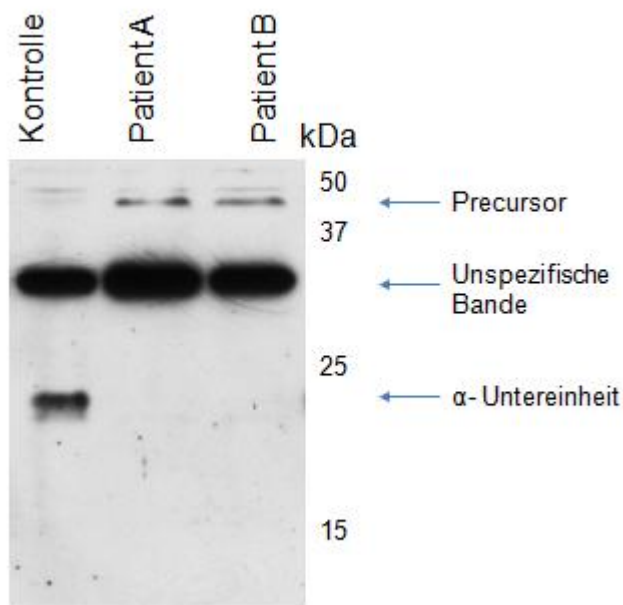


Abbildung 12: Western Blot der Kontrolle (WT-Fibroblasten) und der AGA-T122K-Proteine der beiden Brüder (Patient A und B): Nach Kultivierung der Fibroblasten (Wildtyp und Fibroblasten mit T122K Mutation der beiden Patienten) wurden anschließend Zelllysate hergestellt und die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Lysate (ca. jeweils 30 μ l) wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss der Immundetektion mit α -AGA-Antikörper und GAPDH (als Ladekontrolle) wurde der Film entwickelt. Das unprozessierte AGA (Vorläufer= Precursor) und das prozessierte AGA (hier nur die α -Untereinheit sichtbar) sind gekennzeichnet (\leftarrow). Die unspezifische Bande bei ca. 37 kDa ist wie bei den anderen Blots auch hier zu erkennen.

Ein weiterer Versuch der Charakterisierung und der Lokalisation von AGA mittels IF ist in Abbildung 13 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das T122K-AGA in den Lysosomen befindet (siehe AGU 1 und 2). Außerdem ist festzustellen, dass die Zellen mit T122K-AGA veränderte Lysosomen aufweisen. Sowohl die Form als auch die Größe der Lysosomen sind verändert. Es zeigen sich destrukturierte und schwierig abzugrenzende Lysosomen mit heterogenem Phänotyp. Die veränderte Morphologie sowie die größere Anzahl an Lysosomen bei T122K-AGA-Zellen wird ebenfalls mittels IFs mit Lysotracker-Färbungen in Abbildung 14 bestätigt.

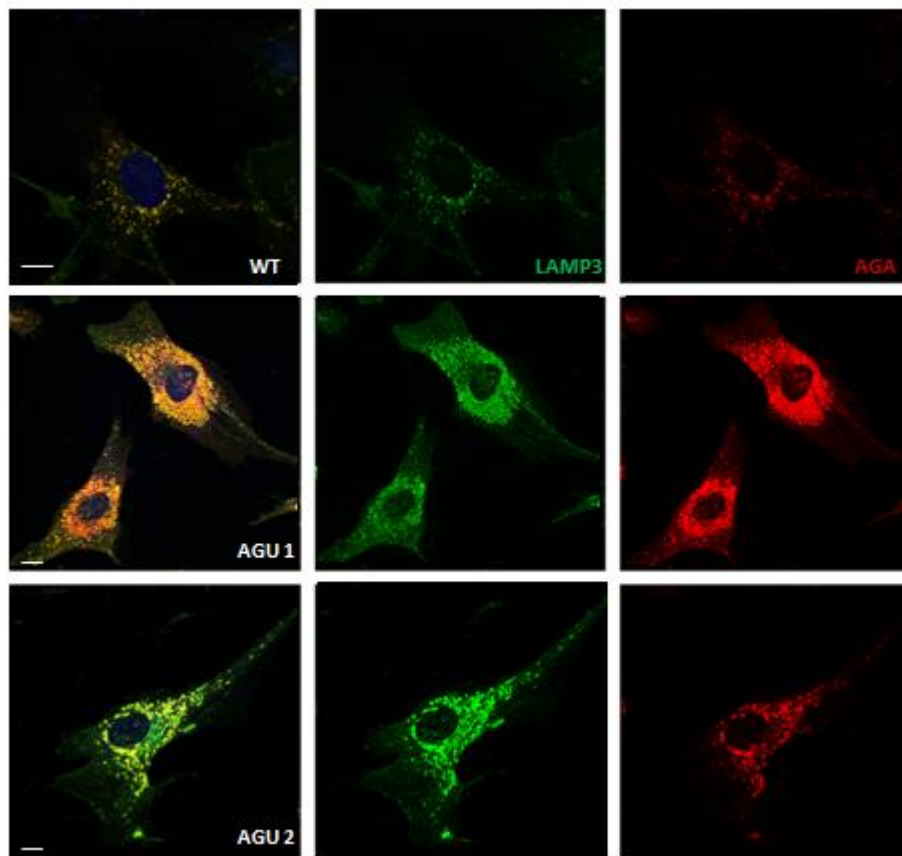


Abbildung 13: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in Fibroblasten

Für die Immunfluoreszenz wurden Wildtyp-Hautfibroblasten und die Hautfibroblasten der beiden Patienten auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert. Die Markierung der Lysosomen erfolgte mit einem spezifischen Antikörper LAMP3 (grün). Das AGA wurde ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper markiert (rot). Die Zellkerne wurden mit dem dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert (blau). Maßstab = 10 μ m.

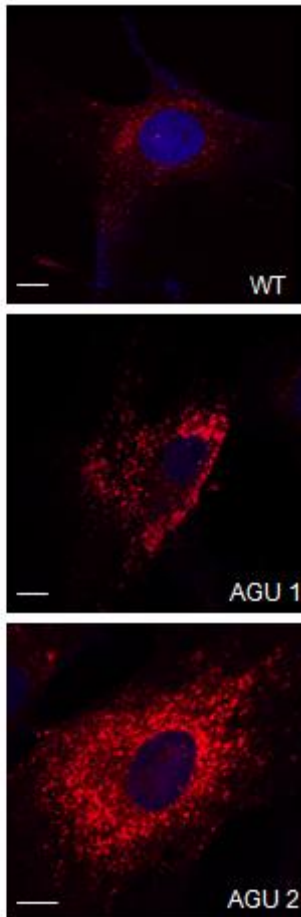


Abbildung 14: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in Fibroblasten mittels Lysotracker. Für die Immunfluoreszenz wurden Wildtyp-Hautfibroblasten und die Hautfibroblasten der beiden Patienten auf Deckgläschen kultiviert. Die Markierung der Lysosomen erfolgte mit dem für saure Organellen spezifischen Farbstoff Lysotracker (rot). Die Zellkerne wurden mit dem dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert (blau). Die Fixierung der Zellen erfolgte mit PFA. Maßstab = 10 µm.

4.3. AGA-Aktivitätsmessungen der Patienten-Fibroblasten

Um die Aktivität des mutierten AGA-T122K der Patienten-Fibroblasten zu untersuchen, wurde zunächst mit dem photometrischen Aktivitätsassay (Tikkanen et al. 1995) gearbeitet. Dieser basiert auf einer kolorimetrischen Messung. Dieser Assay ergab keinen Erfolg und erwies sich als nicht ausreichend sensitiv. Vermutlich war die Aktivitätsmessung in diesem Fall aufgrund einer zu niedrigen endogenen Aktivität des AGAs in den Zellen beeinträchtigt.

Daher wurde die Etablierung und Optimierung des fluorimetrischen AGA-Aktivitätsassays nach Voznyi et al. (1993) und Mononen et al. (1993) durchgeführt. Die Zellen wurden geerntet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der Zellernte

laut Voznyi et al. werden die Zellen pelletiert oder mit Aqua dest gewaschen und in Aqua dest abgeschabt. Außerdem wird 0,25% Triton zugegeben (Voznyi et al. 1993). Laut Mononen et al. wird hingegen empfohlen, die Zellen in 50 mM Tris pH 7.5, 0,5 mM EDTA und 0,2 % Triton zu resuspendieren (Mononen et al. 1993). In dieser Arbeit erfolgt die Zellernte in PBS, das Pellet wird in ca. 200 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis lysiert. Schließlich erfolgte nochmals eine Zentrifugation für 10 min bei 20000 rpm und 4°C. Im Anschluss erfolgte die Bradford-Messung.

Die Ansätze (Inhalt: 2-10 µl des Zellhomogenates (20- 30 µg Protein) bzw. AMC-Standard, 20 µl 50 µM Asp- AMC (in McIlvain's Puffer pH 6,5)) wurden 2-24 h bei 37 °C inkubiert. Laut Mononen et al. reicht eine Inkubationszeit von 1- 4 h. Das Asp-AMC wird, aufgrund der Eigenfluoreszenz, auch in die Standards gegeben. Wegen dieser hohen Eigenfluoreszenz wurde -anders als Voznyi et al. und Mononen et al. empfohlen - eine niedrigere Konzentration an Asp-AMC für die Untersuchungen verwendet.

Die Reaktion wurde durch Versetzung mit 200 µl McIlvain's Puffer pH 4,5 gestoppt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt dann mit einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm. Zuletzt erfolgt die Berechnung der Aktivitäten anhand einer AMC-Standardreihe (Abbildung 15). Nach Voznyi et. al erfolgt die Angabe der Enzymaktivität in nmol/24h pro mg Protein. Hierbei geht man bei normalen Fibroblasten von Aktivitätswerten, die zwischen 63 - 176 nmol/ 24h/mg liegen, aus. Nach Mononen et al. erfolgt die Berechnung in µU/ mg Protein, wobei 1 U = µmol freigesetztem AMC pro min entspricht. Hierbei erfolgt die Umrechnung folgendermaßen:

$$1 \text{ U} = 1000 \text{ nmol/min},$$

$$1 \text{ mU} = 1 \text{ nmol/min},$$

$$1 \text{ µU} = 0,001 \text{ nmol/min} = 0,06 \text{ nmol/h} = 1,44 \text{ nmol/24h}$$

Der Umrechnungsfaktor bei Voznyi/ Mononen entspricht 1/1,44.

Die Berechnung in dieser Arbeit erfolgt über die folgende Formel: µmol/ g Protein/ 24h. Die Aktivität wird außerdem in % Aktivität/ 24h angegeben. Anhand der Standardreihe kann die Eigenfluoreszenz des Asp-AMC von der zu messenden Fluoreszenz subtrahiert werden.

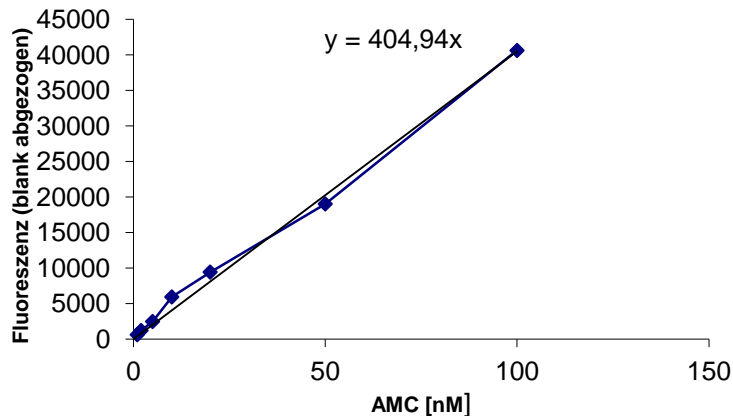


Abbildung 15: Beispiel einer Standardkurve des AMC: Die Standardkurve wurde in McIlvains' Puffer pH 4.5 erzeugt. Zuletzt wurde bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

4.3.1. Aktivität des Patienten-AGAs im Vergleich zum WT-AGA

Die Aktivitätsmessungen erfolgten nach unterschiedlichen Zeiten: 2 Std., 4 Std., 6 Std. und nach 24 Std. Abbildung 16 zeigt, dass die optimale Inkubationszeit von 24 h die verlässlichsten Messungen liefert. In den Abbildungen 17 und 18 ist deutlich zu sehen, dass die Volumina von 5 oder 10 µl der Probe zu empfehlen sind. Das Volumen von 2,5 µl liefert die größten Abweichungen. Schließlich wurde in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt, dass das AGA-T122K der beiden Patienten eine verminderte Aktivität (ca. 10%) im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Es ist auf die große Variation zwischen den Experimenten hinzudeuten (siehe Abb. 17 u. 18).

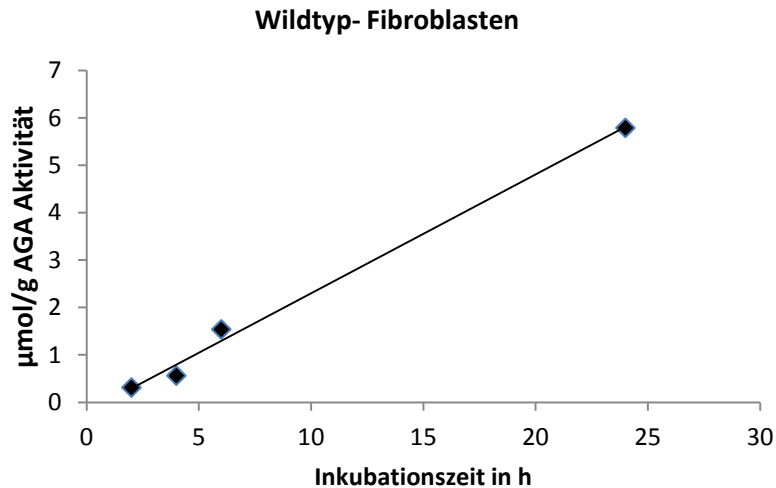


Abbildung 16: AGA-WT-Aktivität in Fibroblasten: Die Aktivitätsmessungen in $\mu\text{mol/g}$ der gewonnenen Wildtyp-Lysate werden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (nach 2, 4, 6 und 24 h) durchgeführt. Es wird gezeigt, dass die ideale Inkubationszeit zur Messung der AGA-Aktivität nach 24 Std erfolgt.

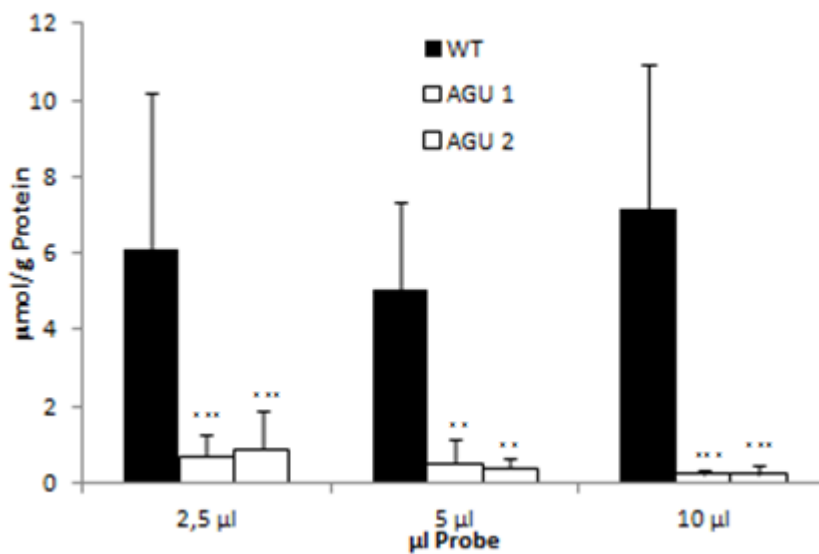


Abbildung 17: AGA-Aktivität in $\mu\text{mol/g}$ bei 2,5 μl , 5 μl und 10 μl Proben: Mit den hergestellten Lysaten (Wildtyp-AGA, AGU 1 und AGU 2) wurden fluorimetrische Aktivitätsmessungen mit unterschiedlichen Volumina (2,5 μl , 5 μl und 10 μl) der Lysate durchgeführt. Es wird ersichtlich, dass die Volumina von 5 μl und 10 μl Probe dem Proben-Volumen von 2,5 μl vorzuziehen sind. N= 5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 11: Auflistung der Standardabweichungen und Mittelwerte der jeweiligen Proben zur Messung der AGA-Aktivität

Volumen	Probe	Mittelwert	Standardabweichung
2,5 µl	WT AGA	6,08	4,08
	AGU 1	0,68	0,56
	AGU 2	0,89	0,99
5 µl	WT AGA	5,06	2,29
	AGU 1	0,52	0,66
	AGU 2	0,38	0,29
10 µl	WT AGA	7,18	3,76
	AGU 1	0,22	0,14
	AGU 2	0,23	0,21

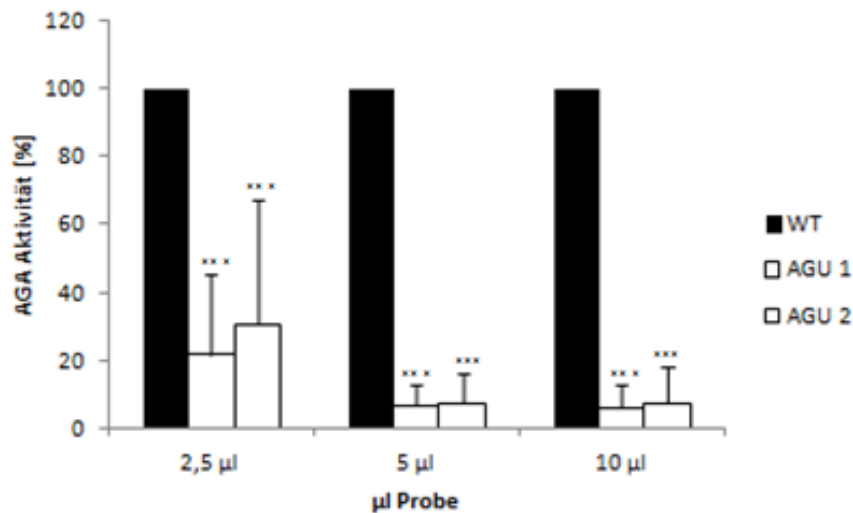


Abbildung 18: AGA-Aktivität in % bei 2.5 µl , 5 µl und 10 µl Proben: Es sind die unterschiedlichen Aktivitäten in % der AGA-Lysate (WT, AGU 1, AGU 2) gezeigt. AGA-T122K der beiden Patienten weist eine verminderte Aktivität (ca. 10%) im Vergleich zum Wildtyp auf. N = 5

5. Diskussion

5.1. Vergleich von AGA-T122K-Mutation mit einigen bekannten AGA-Mutationen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erfolgreiche Klonierung von AGA-T122K in die Plasmide (pEXPR-IBA-103, pCMV-Tag5A und pCDNA3) durchgeführt werden. Diese Mutation zeigt sich als Punktmutation, bei der die Nukleotidsequenz ACA in AAA umgewandelt wird. Hierbei erfolgt der Austausch von Threonin gegen ein Lysin. Die T122K-Mutation befindet sich im Bereich des C-Terminus der α -Untereinheit der Aspartylglukosaminidase. Es zeigt sich das Krankheitsbild der Aspartylglukosaminurie in Form von moderaten Symptomen. Des Weiteren konnte nach Optimierung des fluorimetrischen AGA-Aktivitätsassays (nach Voznyi et al. und Mononen et al. 1993) eine verminderte Aktivität von ca. 10% im Vergleich zur Wildtyp-AGA festgestellt werden.

Die strukturellen Veränderungen sowie Auswirkungen der aus der Literatur bekannten AGU-Mutationen werden im Folgenden denen der T122K-Mutation gegenübergestellt und verglichen. Die relativ aktuell untersuchte Punktmutation c.44T>G führt zu einer L15R Aminosäuresubstitution in der Signalsequenz des AGA-Enzyms. Es zeigten sich nur kleine Mengen des AGA-Polypeptides, aber eine überraschend hohe Aktivität von 37% des Wildtyps, sprich eine wesentlich höhere Restaktivität als die in dieser Doktorarbeit untersuchte T122K-Mutation. Bei dieser zeigt sich eine geringe Aktivität von nur 10%. Diese Substitution (L15R) stört wahrscheinlich die Translokation des AGA-Polypeptides durch Veränderung der entscheidenden hydrophoben Kernstruktur der Signalsequenz. Die geringen Mengen aktiven Enzyms können die Lysosomen dadurch nicht erreichen (Saarela et al. 2004).

Im Gegensatz zu T122K, wo die Substitution im C-Terminus der α -Untereinheit lokalisiert ist, resultiert bei S72P eine Substitution von Serin durch Prolin im aktiven Zentrum des Enzyms (Peltola et al. 1996). Es zeigt sich eine Restaktivität von 30%, die ebenfalls wesentlich höher als die Restaktivität des T122K-AGAs ist. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen S72P und T206 ist notwendig für die AGA-Enzymkatalyse. Die Veränderung der Loop-Struktur im Bereich des aktiven Zentrums der Alpha-Untereinheit verursacht eine abnormale Reifung des Polypeptides und fehlende Stabilisierung von T206 während der autokatalytischen Aktivierung im ER.

Das mutierte Enzym ist jedoch ausreichend korrekt gefaltet, sodass eine Mannose-6-Phosphorylierung und der Transport zu den Lysosomen erfolgen können (Riikonen et al 1995, Tikkanen et al. 1996a). Hier zeigt sich der gleiche Effekt bei dem mutierten AGA mit der T122K-Substitution: der Transport zu den Lysosomen erfolgt trotz Mutation korrekt.

Bei G226D wird Glycin durch die Asparaginsäure substituiert. Das mutierte Polypeptid bei der G226D-Mutation, bei der Glycin durch Asparaginsäure substituiert wird, zeigt eine geringere Restaktivität als T122K-Mutation. Diese liegt lediglich bei $\leq 7\%$, also etwa 3% weniger als die in dieser Doktorarbeit untersuchten Substitution. Die G226D-Mutation ist im Gegensatz dazu nicht in der α -Untereinheit lokalisiert, sondern in der β -Untereinheit bzw. im aktiven Zentrum. Die Mutation verursacht ein räumliches Problem, da durch die lange Seitenkette der Asparaginsäure, welche das Glycin substituiert, das aktive Zentrum blockiert und dadurch eine normale Prozessierung verhindert wird.

Eine weitere Substitution, die anders als T122K nicht in der α -Untereinheit, sondern im aktiven Zentrum lokalisiert ist, stellt die T257I-Punktmutation dar. Hierbei erfolgt der Austausch von Threonin durch das sperrigere, hydrophobe Isoleucin, welches während der enzymatischen Katalyse nicht verwendet werden kann. Es zeigt sich auch hier eine Restaktivität von $\leq 7\%$ (Tikkanen et al. 1996, Saarela et al. 2004), ebenfalls eine geringere Restaktivität als sich bei T122K detektieren lässt.

Einige Mutationen weisen inaktive Vorläufer-Polypeptide, welche inaktiv bleiben und i.d.R. abgebaut werden, auf. Hierzu zählt unter anderem die C163S-Mutation, auch AGU_{Fin-Major}-Mutation genannt. Bei dieser kommt es zum Austausch von Cystein durch Serin. Diese Mutation ist - wie es auch bei der in dieser Doktorarbeit untersuchten T122K-Mutation der Fall ist - im C-terminalen Ende der Alpha-Untereinheit lokalisiert (Mononen et al. 1991, Fisher et Aronson 1991).

Des Weiteren wurden in einer Studie die Phosphotransferase-Erkennungssignale von AGA charakterisiert. Hierbei wurde spekuliert, dass C163S möglicherweise durch veränderte Faltung eine Phosphorylierung verhindert, da diese Mutation in der Nähe der drei Phosphorylierungs-Erkennungsstellen liegt (Tikkanen et al. 1997). In Patientenfibroblasten scheint das C163S-mutierte Polypeptid jedoch in Lysosomen lokalisiert zu sein (A. Banning & R. Tikkanen, in Vorbereitung). Dies stellt eine Gemeinsamkeit mit der mutierten T122K-AGA, die ebenfalls in den Lysosomen lokalisiert ist, dar.

Keine Restaktivität zeigt sich bei der C306R-Mutation. Hier zeigt sich eine totale Fehlfaltung, die schließlich im Abbau des synthetisierten Polypeptides resultiert.

Cystein-Reste haben einen großen Einfluss auf die Bildung von Disulfidbrücken, die zwischen den Ketten bei der Faltung und Aktivierung des Enzyms zu Stande kommen. Die N-terminalen Disulfidbrücken sowohl in den Alpha- als auch in den Beta-Untereinheiten haben eine rein stabilisierende Funktion, wohingegen die C-terminalen Disulfidbrücken anscheinend eine wichtige Rolle in der frühen Faltung und Aktivierung von AGA spielen (Riikonen et al. 1996). Dieser Effekt der Cys-Mutationen ist der Selbe, der sich bei T122K zeigt: Die Mutation ist im C-Terminus der Alpha-Untereinheit lokalisiert. Strukturell ist T122K nicht schwerwiegend, „nur“ der letzte Schritt zur Aktivierung ist nicht korrekt. Würde man dies beheben, wäre die Funktion des AGA-Enzyms korrekt.

Zuletzt wird an dieser Stelle noch Bezug auf weitere relativ neue AGA-Punktmutationen genommen. Bei Qatari-Zwillingen zeigte sich eine c.439C>T Mutation, bei der das hydrophile Serin durch ein unpolares, hydrophobes Prolin an dem 147. Rest ersetzt wird. Prolin-Substitutionen sind dafür bekannt, dass sie zu einer abnormen Faltung und schließlich zu einem dysfunktionellen Enzym mit verminderter Aktivität führen. Strukturell zeigt diese Punktmutation einen höheren Schweregrad als T122K, da hier nur der letzte Schritt der Aktivierung des AGAs angedockt werden müsste, um eine korrekte Funktion zu erzielen.

Die folgenden Mutationen zeigen wie T122K die Lokalisation der Punktmutation im Bereich der Alpha-Untereinheit des AGA-Enzyms. Es zeigte sich bei drei türkischen Geschwistern eine AGA-Punktmutation c.346C>T, bei der am 116. Rest statt Arginin ein Tryptophan vorliegt (Opladen et al. 2014).

Bei zwei chinesischen Familien wurde 2014 ebenfalls eine neue AGA-Punktmutation c.392C>T, bei der Serin am 131. Rest gegen Leucin ausgetauscht wird, festgestellt (Liu et al. 2014).

5.2. Expression und lysosomale Lokalisation von AGA-T122K

Durch Untersuchungen des mutierten AGAs in Hela- und HEK293-Zellen mittels WB-Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das mutierte AGA (α -Untereinheit) kaum prozessiert wird und eine Akkumulation des unprozessierten mutierten AGAs (bei ca. 40 kDa) erfolgt (siehe Abb. 9 und 11). Im Gegensatz dazu findet man in den

mit Wildtyp-AGA transfizierten Zellen sowohl prozessierte als auch unprozessierte AGA. Hierbei ist nur die α -Untereinheit detektierbar. Die β -Untereinheit ist meist nicht zu erkennen, da sie vermutlich zu klein ist oder die Detektion dieser Untereinheit durch den AGA-Antikörper eingeschränkt ist.

Zunächst haben die Färbungen gezeigt, dass die pCMV-Tag-5a transfizierten HeLa-Zellen und stabilen HeLa-Zellen für die eindeutige Charakterisierung des transfizierten AGAs untauglich sind, da große Mengen an endogenem AGA in den Lysosomen vorliegen. Daher wurden weitere Färbungen mit Hautfibroblasten der beiden Patienten durchgeführt.

Die Untersuchung der Lokalisation von AGA-T122K mittels IF mit Hautfibroblasten der beiden Patienten zeigt, dass sich AGA-T122K in den Lysosomen befindet (siehe Abbildung 12).

Entgegen der Vermutung (Riikonen et al. 1996, Ikonen et al. 1991) wird der Vorläufer nicht abgebaut, sondern in den Lysosomen akkumuliert. Daraus lässt sich deuten, dass der Transport durch ER und Golgi bis hin zu den Lysosomen zu funktionieren scheint. Es ist daher anzunehmen, dass das mutierte Enzym soweit korrekt gefaltet ist, dass eine korrekte Mannose-6-Phosphorylierung und ein Transport zu den Lysosomen erfolgen kann.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfolgt die Dimerisierung des AGA-Vorläufers posttranslational im ER und stellt eine Voraussetzung für die Aktivierung des AGAs dar. Nachdem die Vorläufer-Moleküle in die N-terminale α -Untereinheit und die C-terminale β -Untereinheit gespalten wurden, wird das aktive tetramere Molekül gebildet (Riikonen et al. 1995). Aminosäuren, die in der Zwischenverbindung der AGA-Dimer-Polypeptide lokalisiert sind, wie H124, spielen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Interaktion zwischen den beiden Alpha-Beta-Dimeren (Saarela et al. 2001). T122 befindet sich ebenfalls im Bereich der Zwischenverbindung. Auch dies deutet daraufhin, dass bei der T122K-Substitution ebenfalls mit Destabilisierungen, die zu einer Fehlfaltung führen, zu rechnen ist.

Außerdem wurde bewiesen, dass die große Loop-Struktur, die den C-terminalen Abschnitt der Alpha-Untereinheit darstellt, ausschlaggebend für die Dimerisierung, frühe Faltung und Aktivierung der AGA ist (Riikonen et al. 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass zwei Substitutionen von H124 (H124R und H124W), welches sich im Zwischenstück befindet, die Dimerisierung der AGA beeinträchtigen (Saarela et al. 1998). Aufgrund von Prozessierungsfehlern bildeten diese Mutanten nur das unprozessierte Vorläufer-Polypeptid, welches in das Kulturmedium sezerniert wurde,

und somit konnte keine Enzymaktivität detektiert werden. Anscheinend passt die lange Seitenkette des Arginins bzw. des Tryptophans nicht in die relativ enge Lücke zwischen den zwei Vorläufer-Polypeptiden. Bei der T122K-Mutation könnte ein Prozessierungsfehler vorliegen, der zur Akkumulation führt, da die größere Seitenkette des Lysins (im Vergleich zum Threonin) mehr Raum in der engen Lücke zwischen den zwei Vorläufer-Polypeptiden in Anspruch nimmt und somit die 3D-Struktur des AGAs beeinträchtigt. Des Weiteren ist eine Verformung der lokalen Struktur um H124 durch den Austausch von Threonin durch Lysin denkbar. Ähnliches ist bei G100E und A101V-Substitutionen festgestellt worden. Es wurde außerdem in vergangenen Studien gezeigt, dass F135S ebenfalls zu einer Störung der Dimerisierung und Destabilisierung des Loops, welches H124 enthält, führt (Saarela et al. 2004). Die ursprüngliche Umgebung von F135 ist hydrophob. Durch die Substitution mit Serin entsteht eine hydrophile Region, welche die stabilisierenden Van-der-Waals-Kräfte zwischen den zwei Vorläufer-Polypeptiden zerstört. Die verspätete Aktivierung basiert womöglich auf einer beeinträchtigten Dimerisierung im ER durch die fehlende Stabilisierung. Ähnlich der F135S-Mutation kann auch bei T122K-AGA eine Störung der Dimerisierung und Destabilisierung des Loops in der α -Untereinheit durch die Substitution des unbeladenen Threonins durch ein positiv beladenes Lysin vorliegen.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass es bei der AGU_{Fin}-Mutation zu einer Fehlfaltung im Bereich des C-terminalen Endes der Alpha-Untereinheit kommt. Dies basiert auch auf einer Änderung der Flexibilität des AGA-Polypeptides und führt zu einer Entfernung einer intramolekulären S-S-Brückenbindung. Des Weiteren wurde festgestellt, dass diese Polypeptide in vitro nicht phosphoryliert werden und monomer bleiben (Ikonen et al. 1991b & 1991c, Peltola et al. 1996). In aktuellen Untersuchungen mit Fibroblasten der AGU_{Fin}-Mutation zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der T122K-Mutation: Der Vorläufer wird nicht abgebaut und akkumuliert in den Lysosomen, d.h. auch hier scheint der Transport durch ER und Golgi bis hin zu den Lysosomen zu funktionieren (Banning, in Vorbereitung). Beides deutet daraufhin, dass T122K-AGA aufgrund der Substitution zu einer Fehlfaltung im Bereich des C-terminalen Endes der Alpha-Untereinheit führt und somit zur detektierten Akkumulation des Vorläufer-Polypeptides.

5.3. Mögliche Therapieansätze für Aspartylglukosaminurie

Die in den vorigen Abschnitten angesprochenen Mutationen stellen Beispiele für strukturelle Veränderungen, die zur Aspartylglukosaminurie führen, dar. Sie führen zu Faltungsfehlern, Destabilisierungen der dreidimensionalen Struktur des AGA-Polypeptides durch Einbau längerer Aminosäuren bzw. Seitenketten, elektrostatischen Störungen, Verhinderung der Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen oder Beeinträchtigungen der Reste im aktiven Zentrum des AGAs (in dieser Doktorarbeit wurde hierauf experimentell nicht näher eingegangen).

Mit Hilfe der bisher gesicherten Erkenntnisse und vor allem dem Wissen über die dreidimensionale Struktur der humanen Aspartylglukosaminidase (Oinonen et al. 1995) könnten Medikamente bzw. Therapieansätze für die Behandlung von Aspartylglukosaminurie entwickelt und verbessert werden. Derzeit gibt es für AGU noch keine Therapie.

Ein möglicher Therapieansatz könnte die pharmakologische Chaperontherapie (PCT) sein. Die PCT basiert auf dem Prinzip, dass kleinmolekulare Liganden selektiv an mutierte Enzyme binden, diese stabilisieren und die korrekte Faltung begünstigen. Somit kann die Menge an intaktem Enzym in der Zelle erhöht und die Aktivität gesteigert werden. PCT kann entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie mit der Enzym-Ersatz-Therapie (ERT) bei einigen lysosomalen Speicherkrankheiten wie z.B. Morbus Gaucher und Morbus Fabry eingesetzt werden (Lara- Aguilar et al. 2011, Parenti et al. 2015).

Der Transport der T122K-AGA bis zum Lysosom scheint relativ vielversprechend zu sein. Es wäre daher möglich, durch pharmakologische Chaperone das Vorläuferprotein zur Faltung zu bewegen. Aktuell wurde in der AG Tikkanen gezeigt, dass nach Transfektion von AGA-WT und AGA-T122K zusammen in HeLa das AGA-T122K in Gegenwart von AGA-WT prozessiert wird. Eine Faltung von AGA-T122K scheint also zu funktionieren (Banning, in Vorbereitung), da es sich strukturell um keine schwerwiegende Veränderung handelt. Es stellt quasi der letzte Schritt zur korrekten Aktivierung des Enzyms die Andockstelle dar, um eine normale Funktion von AGA zu erreichen. Zudem wurden in der AG Tikkanen mögliche Substanzen für PCT identifiziert, welche die Aktivierung von T122K und AGU_{-Fin-major}-Enzyme bewirken können. Ein weiterer Therapieansatz zeigt sich im Bereich der Gen- und Stammzelltherapie bzw. Knochenmarkstransplantation.

In einer Studie wurde gezeigt, dass die allogene Knochenmarkstransplantation langsam die pathologischen, biochemischen und MRT-Befunde bei AGU-Patienten normalisieren kann (Autti et al. 1999). Jedoch wird die Knochenmarkstransplantation aufgrund der Postransplantations-Komplikationen und der bestehenden dysmorphologischen Veränderungen zur Behandlung von AGU-Patienten nach dem Kindesalter nicht empfohlen (Arvio et al. 2001). In Studien an Mäusen wurde verdeutlicht, dass eine Akkumulation von AGA im Gehirngewebe von jungen Mäusen im Vergleich zu älteren Mäusen durch ERT wesentlich stärker reduziert werden konnte. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der frühen Erkennung und Behandlung von Aspartylglukosaminurie (Kelo et al. 2005, Dunder et. al 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass genetisch modifizierte Stammzellen mit den entsprechenden Enzymgenen die Pathologie abschwächen und die Lebenserwartung der Tiere mit lysosomalen Speicherkrankheiten effektiv verlängern konnten (Kim 2014). Stammzell- und Gentherapie müssen noch weiterhin optimiert und untersucht werden, um effizient in der Behandlung von AGU eingesetzt werden zu können.

Ein neuer Therapieansatz zeigt sich im CRISPR-Cas-System (Charpentier et al. 2014 und 2015). Das prokaryotische adaptive Immunsystem ist in einem Abschnitt auf der DNA, welches aus kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen (Repeats) besteht, den sogenannten CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), und in ihren assoziierten Proteinen (Cas) verschlüsselt. Das CRISPR-Cas-System hat die Funktion, die Prokaryoten vor infektiösen Viren und Plasmiden zu schützen. Die Immunreaktion wird durch Cas-Nukleasen, welche kleine RNA-Stränge (die crRNAs) zur Erkennung von Spaltungsabschnitten der eindringenden Nukleinsäuren nutzen, vermittelt. Beim Typ II-CRISPR-Cas-System erfolgt die DNA-Spaltung durch ein einzelnes Enzym, die Cas9. Durch Verwendung von synthetisch hergestellten Einzelstrang-RNAs könnte Cas9 so genutzt werden, dass spezifische DNA-Doppelstrangbrüche im Genom von AGU-Patienten durchgeführt werden könnten. Durch zelleigene Reparaturmechanismen wird der DNA-Defekt anschließend behoben. Eine weitere Reparatur-DNA ist notwendig, um keine neue Mutation hinzuzufügen. Das CRISPR-Cas-System stellt ein wichtiges, schnelles sowie einfaches Tool im Bereich des Genome Editings dar, welches in Zukunft eine wichtige Rolle in der Therapie vieler Erkrankungen wie z.B. Hämophilie A, Leukämie, Muskelschwund, HIV einnehmen könnte. Aktuell ist das CRISPR-Cas-System nicht so weit ausgereift, sodass es nur in besonderen Fällen anwendbar ist.

5.4. Ausblick

AGA gehört zu den am besten charakterisierten lysosomalen Enzymen. Aspartylglukosaminurie ist eine seltene, autosomal rezessive, lysosomale Speicherkrankheit, welche sich früh zu einer fortschreitenden geistigen Behinderung entwickelt. Die Krankheit wurde 1986 entdeckt und es wurden seitdem zahlreiche Mutationen im Aspartylglukosaminidase-Gen charakterisiert. Die Rolle der Expression, des Transportes, der Prozessierung, der dreidimensionalen Struktur und der Aktivierung des AGAs konnte im Detail in den unterschiedlichen AGA-Mutanten in der Vergangenheit dargestellt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine neue AGA-Mutation, T122K, genauer untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das unprozessierte Vorläufer-Protein in den Lysosomen akkumuliert. Das T122K-AGA zeigt eine Restaktivität von ca. 10% im Vergleich zum Wildtyp-AGA. In Immunfluoreszenzfärbungen lässt sich zeigen, dass die Anzahl der Lysosomen sowie ihre Form und Größe verändert sind.

Die genaue Charakterisierung der T122K-Mutation führt zu einem besseren Verständnis der Pathologie der Aspartylglukosaminurie. Außerdem lässt sich die Funktion und die Wichtigkeit der korrekten Struktur des AGA-Moleküls anhand dieser Mutation verdeutlichen.

Zukünftig könnte man einen Vergleich der AGU_{Fin}-Mutationen mit der AGU-T122K-Mutation anhand von Fibroblasten durchführen. Hierbei könnte man anhand von Western Blots die AGA-Prozessierung, anhand von fluorimetrischen Aktivitätsmessungen die Aktivität des AGA-Enzyms und mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die Lokalisation der AGA-Mutanten untersuchen.

Untersuchungen der Aktivität und Prozessierung von mutierten AGAs wie sie in dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, können in Zukunft auch mit Zellen von anderen Patienten mit anderen Mutationen, zusätzlich zu AGU_{Fin}-Mutationen, durchgeführt werden, beispielsweise mit im Labor vorhandenen Zellen der Mutationen S72P und W168X. Zusätzlich kann eine weitere Bestätigung der Lokalisation des AGA-T122Ks in den Lysosomen mittels adäquaten Marker-Proteinen unternommen werden.

Diese Doktorarbeit liefert Daten, die für die Therapie von Aspartylglukosaminurie mit AGA-T122K-Mutationen nützlich sein können. Weitere Schritte im Rahmen der AGU-Forschung, vor allem im Bereich der Etablierung und Entwicklung angemessener und hilfreicher therapeutischer Methoden wie Gentherapie, Enzyzersatztherapie sowie Chaperontherapie, könnten das Leiden der AGU-Patienten und ihrer Familien mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse vielleicht in Zukunft lindern. Es könnten zukünftig weitere Tests mit pharmakologischen Chaperonen, welche die Prozessierung von AGA-T122K unterstützen, durchgeführt werden. Hierbei könnte man sowohl Patientenfibroblasten als auch rekombinantes AGA-Protein, also aus Zellkulturmedium isoliertes, aufgereinigtes AGA, mit Chaperonen behandeln und dann Enzymaktivität und Prozessierung untersuchen.

6. Abstract

Aspartylglucosaminidase (AGA) is a lysosomal hydrolase that participates in glycoprotein breakdown. It catalyzes the cleavage of N-glycosidic bonds between asparagine and N-acetylglucosamine. AGA is synthesized as an inactive precursor molecule that has 346 amino acids. It is rapidly cleaved into alpha and beta subunits. AGA is autoproteolytically activated by dimerization of two inactive precursor molecules. The active AGA is a tetrameric molecule that is transported to lysosomes by the mannose-6-phosphate pathway (Tikkanen et al. 1995, 1997). Wildtype AGA is very heat-stable and resistant to denaturation by SDS (Tollersrud und Aronson 1989, Enomaa et al. 1992). The location of the AGA gene was defined to 4q32-33 and spans 10668 bp.

Mutations in the AGA-gene lead to a lysosomal storage disease, aspartylglucosaminuria (in short: AGU), which is caused by a deficient activity of AGA. The mode of heritage is monogenic and autosomal recessive. AGU is enriched in the Finnish population where the disease incidence is 1: 16 000. The lack of AGA activity causes accumulation of glycoasparagines in lysosomes, resulting in a phenotype with progressive mental retardation, coarse facial features, and skeletal and connective tissue abnormalities. In addition, glycoasparagines are excreted in the urine. The life expectancy is 35 - 40 years. The AGU_{fin-major}-mutation represents 98% of all Finnish disease alleles. This mutation causes an amino acid replacement (C163S) in the AGA polypeptide.

In this project, I have worked with the point mutation T122K, where threonine is substituted by lysine in the alpha-subunit. My aims of this project were: Cloning of wildtype and T122K-AGA into different expression plasmids, analysis of the localization of endogenous and transfected AGA by immunofluorescence staining, the AGA expression and processing and the AGA activity measurements.

After cloning of AGA wildtype and AGA-mutation-T122K and transfection into different cell lines, it could be shown that the mutated AGA is not processed, while there is accumulation of precursor AGA. The same result was shown in patient skin fibroblasts. From the immunofluorescence stainings it was concluded that AGA-T122K is transported into lysosomes. The AGA activity measurements showed that AGA-T122K patients have less AGA-activity (about 10%) than the control persons with two wildtype alleles.

7. Zusammenfassung

Aspartylglukosaminidase (kurz: AGA) ist eine lysosomale Hydrolase, welche am Abbau von Glykoproteinen beteiligt ist. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglukosamin. AGA wird als inaktive 346 Aminosäuren große Vorstufe synthetisiert. Es wird zügig in Alpha- und Beta-Untereinheiten gespalten. AGA wird autoproteolytisch durch Dimerisierung von zwei inaktiven Molekülen aktiviert. Das aktive AGA ist ein tetrameres Molekül, welches über den Mannose-6-Phosphat-Transportweg zu den Lysosomen gelangt (Tikkanen et al. 1995, 1997). Wildtyp AGA ist sehr hitzestabil und resistent gegen Denaturierung durch SDS (Tollersrud und Aronson 1989, Enomaa et al. 1992). Das AGA-Gen ist in der Chromosomen-Region 4q32-33 definiert und umfasst 10668 Basenpaare.

Mutationen des AGA-Gens führen zur lysosomalen Speicherkrankheit Aspartylglukosaminurie (kurz: AGU). Diese Krankheit wird durch eine eingeschränkte Aktivität von AGA verursacht. Die Vererbung erfolgt meist monogen und autosomal rezessiv. AGU tritt vor allem in der finnischen Bevölkerung auf, wo die Inzidenz bei 1:16000 liegt. Die eingeschränkte AGA-Aktivität führt zur Akkumulation von Glycoasparaginen in den Lysosomen. Dies führt zu einem Phänotyp mit progressiver geistiger Behinderung, groben Gesichtszügen sowie skelettalen und bindegewebigen Abnormalitäten. Außerdem sind erhöhte Mengen von Glykoasparaginen im Urin nachzuweisen. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei 35 - 40 Jahren. Die AGU_{Fin-major}-Mutation repräsentiert ca. 98% der finnischen AGU-Allele. Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch (C163S) im AGA-Polypeptid.

In dieser Doktorarbeit habe ich mich mit der AGU-Punktmutation T122K, bei der Threonin gegen Lysin in der Alpha-Untereinheit ausgetauscht ist, beschäftigt. Meine Ziele waren: Die Klonierung von Wildtyp und T122K-AGA in verschiedene Expressionsplasmide, die Lokalisation von AGA mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen, die AGA - Expression und Prozessierung sowie AGA-Aktivitätsmessungen.

Nach Klonierung und Transfektion von AGA-Wildtyp und AGA-T122K wurde bewiesen, dass das mutierte AGA nicht prozessiert wird, während sich die Vorstufe von AGA ansammelt. Dasselbe Ergebnis wurde mit Hilfe von Patienten-Haut-Fibroblasten gezeigt. Das T122K-AGA wurde in den Lysosomen lokalisiert. Die AGA-Aktivitätsmessungen haben aufgezeigt, dass AGA-T122K eine geringere AGA-Aktivität als die Wildtypen besitzt (ca. 10%).

8. Abkürzungsverzeichnis

AADG	2-Acetamido-1-β- (L-Aspartamido)-1,2-Dideoxy-D-Glucose
AGA	Aspartylglukosaminidase
AGU	Aspartylglukosaminurie
AGU _{Fin-major}	Doppelmutation 482G->A + 488G->C, R161Q + C163S
AP	Adapter-Protein-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
DABCO	1, 4.-Diazabicyclo [2,2,2]octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
ERQC	ER Qualitätskontrolle
FCS	Fötales Kälberserum
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HCL	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
kb	Kilobasenpaar
kDA	Kilodalton
MeOH	Methanol
MPR	Mannose 6-Phosphat-Rezeptor

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Para-Formaldehyd
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TBST	Tris-Buffered-Saline & Tween
TEMED	N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
UPR	Misfolded Protein Response
WT	Wildtyp
Å	Ångström (10^{-10} m)

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Lysosomen als biochemisches Konzept“ modifiziert nach De Duve 1963	1
Abbildung 2: „Biosynthetischer und endozytotischer Signalweg“ modifiziert nach Le Borgne et al. 1998	3
Abbildung 3: „Strukturen des humanen Glycosylasparaginase- Gens (AGA) und - Proteins mit der Lokalisation der AGU Mutationen“ modifiziert nach Aronson Jr. 1999.	7
Abbildung 4: „Der katalytische Mechanismus von AGA“ modifiziert nach Tikkanen et al. 1995	8
Abbildung 5: „Karte der bekannten AGU- Mutationen“ aktualisiert und modifiziert nach Sareela 2004	11
Abbildung 6: Agarosegelelektrophorese von AGA- WT (1-3) mit pcMV- tag- 5a und AGA- T122K (4-6) mit pEXPR- IBA- 103 als Vektor	34
Abbildung 7: DNA-Sequenzen von AGA-WT im Vergleich zu AGA- T122K- Punktmutation	34
Abbildung 8: Western- Blot von pcMV-tag-5a, AGA- WT A, AGA- WT B, AGA- T122K- A und AGA- T122K- B	35
Abbildung 9: Western- Blot von pcMV-tag- 5a, AGA- WT A, AGA- WT B, AGA- T122K- A und AGA- T122K- B	36
Abbildung 10: Western- Blot von pcDNA3, AGA- WT und AGA- T122K in HeLa-Zellen	37
Abbildung 11: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in stabilen HeLa- Zellen (pcDNA3)	38
Abbildung 12: Western Blot der Kontrolle (WT- Fibroblasten) und der AGA-T122K- Proteine der beiden Brüder (Patient A und B)	39
Abbildung 13: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in Fibroblasten	40
Abbildung 14: Charakterisierung der lysosomalen Lokalisation von AGA in Fibroblasten mittels Lysotracker	41
Abbildung 15: Beispiel einer Standardkurve des AMC	43
Abbildung 16: AGA-WT-Aktivität in Fibroblasten	44
Abbildung 17: AGA- Aktivität in $\mu\text{mol/g}$ bei 2,5 μl , 5 μl und 10 μl Proben	44
Abbildung 18: AGA- Aktivität in % bei 2.5 μl , 5 μl und 10 μl Proben	45

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung	13
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung	15
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung	16
Tabelle 4: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen und deren Hersteller	18
Tabelle 5: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primärantikörper, den jeweiligen Verdünnungen und eingesetzten Volumina, sowie deren Hersteller	18
Tabelle 6: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller	19
Tabelle 7: Bezeichnung des in der Doktorarbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes, der jeweiligen Verdünnung und dessen Hersteller	19
Tabelle 8: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Hersteller	20
Tabelle 9: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen, sowie deren Schnittstellen	20
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien und des Bakterienstamms, sowie deren Hersteller. Zusätzlich werden weitere wichtige Informationen aufgeführt.	21

11. Literaturverzeichnis

Araki, K., Nagata, K. (2011): Protein folding and quality control in the ER. Cold Spring Harb Perspect Biol. **3**(11):a007526.

Arvio P, Arvio M, Kero M, Pirinen S, Lukinmaa P., (1999): Overgrowth of oral mucosa and facial skin, a novel feature of aspartylglucosaminuria, J Med Genet. **36**:398–404.

Arvio M, Sauna-Aho O, Peippo M. (2001): Bone marrow transplantation for aspartylglucosaminuria: follow-up study of transplanted and non-transplanted patients. J Pediatr. **138**(2):288-90.

Autti T, Rapola J, Santavuori P, Raininko R, Renlund M, Liukkonen E, Lauronen L, Wirtavuori K, Hietala M, Saarinen-Pihkala U., (1999): Bone marrow transplantation in aspartylglucosaminuria--histopathological and MRI study. Neuropediatrics. **30**(6):283-8.

Bainton, D. F. (1981): The discovery of lysosomes. J Cell Biol. **91**:66-76.

Banning A, Gülec C, Rouvinen J, Gray SJ, Tikkanen R. (2016) Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. Sci. Rep. **6**, 37583; doi: 10.1038/srep37583

Braun, M., Waheed, A. and Figura, K. von (1989): Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via cell surface. EMBO J. **8**:3633-3640.

Charpentier E, Marraffini LA. (2014): Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. Curr Opin Microbiol. **19**:114-9.

Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF (2015): Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. FEMS Microbiol Rev. **39**(3):428-41.

De Duve, C. (1963): The lysosome concept. In Lysosomes, Ciba Found. Symposium. 1-35.

De Duve, C. (1963): Lysosomes revisited. Eur J Biochem. **137**:391-7.

Dinner, A. R., A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson und M. Karplus (2000): Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. Trends Biochem. Sci. **25**(7):331-339.

Dunder U, Valtonen P, Kelo E, Mononen I. (2010): Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglycosaminuria mice. *J Inher Metab Dis.* **33**(5):611-7.

Eppstein, C.J., Goldberger, R. F. und Anfinsen, C.B. (1963): Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **28**:439.

Fisher K.J., O.K. Tollersrud, N.N. Aronson Jr.(1990): Cloning and sequence analysis of a cDNA for human glycosylasparaginase. A single gene encodes the subunits of this lysosomal amidase. *FEBS Lett.* **269**:440-444.

Fisher K.J., Aronson NN Jr., (1991): Characterization of the mutation responsible for aspartylglucosaminuria in three Finnish patients. Amino acid substitution Cys163Ser abolishes the activity of lysosomal glycosylasparaginase and its conversion into subunits. *J Biol Chem.* **266**(18):12105-13.

Fu XL., Gao DS. (2014): Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: the regulative mechanism of organisms against stress injuries. *Biofactors.* **40**(6):569-85.

Grön K, Aula P, Peltonen L. (1990): Linkage of aspartylglucosaminuria (AGU) to marker loci on the long arm of chromosome 4. *Hum Genet.* **85**(2):233-6.

Gupta A, Read DE, Gupta S. (2015): Assays for induction of the unfolded protein response and selective activation of the three major pathways. *Methods Mol Biol.* **1292**:19-38.

Haltia M, Palo J, Autio S. (1975): Aspartylglycosaminuria: a generalized storage disease. Morphological and histochemical studies. *Acta Neuropathol.* **31**(3):243-55.

Hamer, Van Beersel G, Arnould T, Jadot M. , (2012): lipids and lysosomes, *Curr Drug Metab.*

Hardesty B, Tsalkova T, Kramer G., (1999): Co-translational folding, *Curr Opin Struct Biol.* **9**(1):111-4.

Höning S, Griffith J, Geuze HJ, Hunziker W. (1996): The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* **15**(19):5230-9.

Höning, S., Sandoval. I.V. and Figura, K. von (1998): A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* **17**:1304-1314.

Huang JT., Xing DJ., Huang W., (2012): Relationship between protein folding kinetics and amino acid properties. *Amino Acids.* **43**(2):567-72.

Ikonen E., Aula P., Grön K., Tollersrud O., Halila R. , Manninen T., Syvänen A.- S., Peltonen L. (1991a): Genetics Spectrum Of mutations in aspartylglucosaminuria *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.**88**, pp. 11222-11226.

Ikonen E, Baumann M, Grön K, Syvänen AC, Enomaa N, Halila R, Aula P, Peltonen L., (1991b): Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutation causing the disease., *EMBO J.* **10**(1):51-8.

Ikonen E, Enomaa N, Ulmanen I, Peltonen,(1991c): In vitro mutagenesis helps to unravel the biological consequences of aspartylglucosaminuria mutation. *Genomics.* **11**(1):206-11.

Ikonen E, Julkunen I, Tollersrud OK, Kalkkinen N, Peltonen L. (1993): Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **12**(1):295-302.

Kelo E, Dunder U, Mononen I. (2005): Massive accumulation of Man2GlcNAc2-Asn in nonneuronal tissues of glycosylasparaginase-deficient mice and its removal by enzyme replacement therapy. *Glycobiology.* **15**(1):79-85.

Kim SU. 2014: Lysosomal storage diseases: Stem cell-based cell- and gene-therapy. *Cell Transplant.*

Kulkarni P., Rajagopalan K., Yeater D. ,Getzenberg RH., (2011): Protein folding and the order/ disorder paradox. *J Cell Biochem.* **112**(7):1949-52.

Kundra, R. and Kornfeld, S. (1999): Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**:31039-31046.

Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT , (2008): lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis, *Histochem Cell Biol.* 389-406.

Laitinen A, Hietala M, Haworth JC, Schroeder ML, Seargeant LE, Greenberg CR, Aula P. (1997): Two novel mutations in a Canadian family with aspartylglucosaminuria and early outcome post bone marrow transplantation. *Clin Genet*. **51**(3):174-8.

Lara-Aguilar RA, Juárez-Vázquez CI, Medina-Lozano C, (2011): Therapy of lysosomal storage diseases: update and perspectives. *Rev Invest Clin*. **63**(6):651-8.

Le Borgne R, Hoflack B., (1998): protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta*. **1404**(1-2):195-209.

Liu Y, Zou L, Meng Y, Zhang Y, Shi X, Ju J, Yang G, Hu L, Chen X. (2014): A family with two children diagnosed with aspartylglucosaminuria-case report and literature review, *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. **52**(6):455-9.

Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mutlock, B. M. and Piper, R. C. (2000): Lysosome- endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci*, **113**:1515-24.

Mindell JA. (2012): lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*. **74**:69-86.

Mononen, N Heisterkamp, V Kaartinen, J C Williams, J R Yates, 3rd, P R Griffin, L E Hood, and J Groffen, (1991): Aspartylglycosaminuria in the Finnish population: identification of two point mutations in the heavy chain of glycoasparaginase. *Natl Acad Sci U S A*. **88**(7):2941–2945.

Mononen IT, Kaartinen VM, Williams JC. (1993): A fluorometric assay for glycosylasparaginase activity and detection of aspartylglycosaminuria. *Anal Biochem*. **208**(2):372-4.

Morris C, Heisterkamp N, Groffen J, Williams JC, Mononen I. (1992): Chromosomal localization of the human glycoasparaginase gene to 4q32-q33. *Hum Genet*. **88**(3):295-7.

Nathan N. Aronson Jr. (1999): review: Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1455**:139-154.

Oinonen C, Tikkanen R, Rouvinen J, Peltonen L. (1995): three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat Struct Biol*. **2**(12):8-1102.

Opladen T, Ebinger F, Zschocke J, Sengupta D, Ben-Omran T, Shahbeck N, Moog U, Fischer C, Bürger F, Haas D, Ruef P, Harting I, Al-Rifai H, Hoffmann GF.(2014): Aspartylglucosaminuria: unusual neonatal presentation in Qatari twins with a novel aspartylglucosaminidase gene mutation and 3 new cases in a Turkish family, *J Child Neurol.* **29**(1):36-42.

Parenti G, Andria G, Valenzano KJ, (2015): Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders, *Mol Ther.* **23**(7):1138-48.

Park H, Fisher KJ, Aronson NN Jr. (1991): Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase., *FEBS Lett.* **288**(1-2):168-72.

Peltola M¹, Tikkanen R, Peltonen L, Jalanko A. (1996): Ser72Pro active-site disease mutation in human lysosomal aspartylglucosaminidase: abnormal intracellular processing and evidence for extracellular activation. *Hum Mol Genet.* **5**(6):737-43.

Peltola M, Kyttälä A, Heinonen O, Rapola J, Paunio T, Revah F, Peltonen L, Jalanko A. (1998): Adenovirus-mediated gene transfer results in decreased lysosomal storage in brain and total correction in liver of aspartylglucosaminuria (AGU) mouse. *Gene Ther.* **5**(10):1314-21.

Peters, C. and Figura, K. von (1994): Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **346**:108-114.

Pollitt RJ, Jenner FA, Merskey H. (1968): Aspartylglycosaminuria. An inborn error of metabolism associated with mental defect. *Lancet*, **3**:2(7562):253-5.

Riikonen A, Ikonen E, Sormunen R, Lehto VP, Peltonen L, Jalanko A. (1994): Dissection of the molecular consequences of a double mutation causing a human lysosomal disease. *DNA Cell Biol.* **13**(3):257-64.

Riikonen A, Tikkanen R, Jalanko A, Peltonen L. (1995): Immediate interaction between the nascent subunits and two conserved amino acids Trp34 and Thr206 are needed for the catalytic activity of aspartylglucosaminidase. *J Biol Chem.* **270**(9):4903-7.

Riikonen A, Rouvinen J, Tikkanen R, Julkunen I, Peltonen L, Jalanko A. (1996): Primary folding of aspartylglucosaminidase. Significance of disulfide bridges and evidence of early multimerization. *J Biol Chem.* **271**(35):21340-4.

Rip JW, Coulter-Mackie MB, Rupar CA, Gordon BA. (1992): Purification and structure of human liver aspartylglucosaminidase. *Biochem J.* **288** (Pt 3):1005-10.

Rothman JE, Schekman R. (2011): molecular mechanism of protein folding in the cell. *Cell.* **146**(6):851-4

Saarela J, Laine M, Tikkanen R, Oinonen C, Jalanko A, Rouvinen J, Peltonen L. (1998): Activation and oligomerization of aspartylglucosaminidase. *J Biol Chem.* **273**(39):25320-8.

Saarela J, Laine M, Oinonen C, von Schantz C, Jalanko A, Rouvinen J, Peltonen L., (2001): Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. *Hum Mol Genet.* **10**(9):983-95.

Saarela J, von Schantz C, Peltonen L, Jalanko A. (2004): A novel aspartylglucosaminuria mutation affects translocation of aspartylglucosaminidase. *Hum Mutat.* **24**(4):350-1.

Saftig P, Klumperman J (2009): Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 10:623–635.

Saier, M. H., Jr. (1999): Eukaryotic transmembrane solute transport systems. *Int Rev Cytol.* **190**:61-136.

Sippl, M. J., M. Ortner, M. Jaritz, P. Lackner und H. Flockner (1996): Helmholtz free energies of atom pair interactions in proteins. *Fold Des.* **1**(4) 289-298.

Tikkanen R, Riikonen A, Oinonen C, Rouvinen R, Peltonen L. (1996): Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation. *EMBO J.* **15**(12):2954-60.

Tikkanen R, Rouvinen J, Törrönen A, Kalkkinen N, Peltonen L. (1996): Large-scale purification and preliminary x-ray diffraction studies of human aspartylglucosaminidase., *Proteins.* **24**(2):253-8.

Tikkanen R, Peltola M, Oinonen C, Rouvinen J, Peltonen L. (1997): Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase, *EMBO J.* **16**(22):6684-93.

Tollersrud O, Nilssen O, Tranebjaerg L, and Borud O;(1994: Aspartylglucosaminuria in northern Norway: a molecular and genealogical study. *J Med Genet.* **31**(5):360–363.

Uusitalo A, Tenhunen K, Tenhunen J, Matikainen S, Peltonen L, Jalanko A. (1997): Expression and regulation of the human and mouse aspartylglucosaminidase gene. *J Biol Chem.* **272**(14):9524-30.

Voznyi YaV, Keulemans JL, Kleijer WJ, Aula P, Gray GR, van Diggelen OP (1993): Applications of a new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of aspartylglucosaminuria. *J Inherit Metab Dis.* **16**(6):929-34.

Valkonen S, Hietala M, Savontaus ML, Aula P. (1999): Origin of Finnish mutations causing aspartylglucosaminuria. *Hereditas.* **131**(3):191-5.

Wei J, Hendershot LM. (1996): Protein folding and assembly in the endoplasmic reticulum. *EXS.* **77**:41-55.

Xu H, Ren D. (2015): lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol.* **77**:57-80.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich schließlich noch bei allen bedanken, die mich unterstützt und mir bei meiner Doktorarbeit geholfen haben.

Besonders bedanke ich mich bei Frau **Prof. Dr. Ritva Tikkanen** für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit sowie das Engagement und Unterstützung bei der Durchführung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dich, **Antje**. Ich bedanke mich für die hervorragende, motivierende Betreuung. Ich danke dir vor allem für deine Geduld und deine Freundlichkeit während dieser Zeit. Du hast keine meiner Fragen unbeantwortet gelassen. Ich habe viel von dir gelernt.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Ralf, Petra, Bincy, Melanie, Nina, Sina, Frauke** und **Wymke** für die Hilfe im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern, die mir während des Studiums und dieser Arbeit aufopfernd und motivierend beistanden.